



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

Comparação da utilização exclusiva de osso esponjoso autólogo com a utilização mista de osso esponjoso autólogo e fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) na cicatrização do espaço criado pela osteotomia realizada na técnica de *tibial tuberosity advancement* (TTA)

Francisco do Ó Ramos da Silveira

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Mário António Pereira da Silva
Soares de Pinho
Doutor António José de Almeida Ferreira
Doutor Luís Miguel Alves Carreira

ORIENTADOR

Doutor António José de Almeida Ferreira

CO-ORIENTADOR

Doutora Ana Mafalda Gonçalves Xavier
Félix Lourenço

2013

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

Comparação da utilização exclusiva de osso esponjoso autólogo com a utilização mista de osso esponjoso autólogo e fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) na cicatrização do espaço criado pela osteotomia realizada na técnica de *tibial tuberosity advancement* (TTA)

Francisco do Ó Ramos da Silveira

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Mário António Pereira da Silva
Soares de Pinho
Doutor António José de Almeida Ferreira
Doutor Luís Miguel Alves Carreira

ORIENTADOR

Doutor António José de Almeida Ferreira

CO-ORIENTADOR

Doutora Ana Mafalda Gonçalves Xavier
Félix Lourenço

2013

LISBOA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus avós António, Irene, Virgílio e Maria Helena mas também ao meu tio-avô João Duarte, na esperança de que este corresponda às suas expectativas.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus, que pela sua graça permitiu que hoje tivesse chegado ao culminar do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária e cujo apoio incondicional me permitiu superar as adversidades nesse percurso.

Agradeço também aos meus Pais e ao meu irmão João, por terem compensado a minha ausência de variadíssimas tarefas cujo meu grau de ocupação no meu último ano lectivo não me permitiu cumprir, também por todo o apoio dado e por ser o produto da sua dedicação.

Ao Professor Doutor António José de Almeida Ferreira, pela orientação cuidadosa, pela paciência e pelo seu envolvimento na minha formação como futuro Médico Veterinário, pelo seu interesse e curiosidade científica incansáveis pela Clínica e Cirurgia de Animais de Companhia, por ter permitido tornar real o ensaio clínico em causa e por ter acreditado na minha ideia, de onde resulta uma dívida não mensurável da minha parte.

Ao Professor Doutor Luís Miguel Alves Carreira que assumiu uma posição marcante na minha vida, pela amizade e apoio inabaláveis e incondicionais, pela preocupação simultânea em formar-me como Médico Veterinário e como Homem e pela exigência técnica e científica pela qual sempre primou e que sempre exigiu aos seus orientandos. Por me ter protegido e guiado sempre, ficará eternamente como alguém a quem me é impossível retribuir na totalidade o que me deu. Inquestionavelmente, um dos meus modelos a seguir pessoal e profissionalmente.

À Professora Doutora Ana Mafalda Lourenço, pelo apoio e ajuda pessoal e profissional ao longo de todo o curso e especialmente neste último ano, pelos conselhos e pela amizade e confiança que depositou em mim. Acima de tudo, pela ajuda na superação das dificuldades encontradas, não tendo nem a distância, nem tão pouco as horas tardias, sido um obstáculo à sua constante disponibilidade e simpatia. A si, muitíssimo obrigado por tudo!

À Professora Sandra Jesus e ao Professor Hugo Pissarra, pela amizade e apoio na elaboração desta dissertação.

Ao Dr. Rodrigo Marques Bom pelo apoio na realização das cirurgias que serviram de modelo ao ensaio prático e por ter arranjado a centrífuga que tornou possível esse mesmo trabalho.

A todo o corpo clínico, enfermeiros, auxiliares e administrativos do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da actual Universidade de Lisboa (FMV-UL), pela amizade, apoio, paciência, compreensão, pela vontade de formar bons Médicos Veterinários, pela exigência, pela ajuda pessoal e profissional.

O Professor Doutor Rogério Salema de Araújo Puga Leal e à Professora Doutora Ana Sofia Leonardo Vilela de Matos, docentes da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa, pela simpatia e disponibilidade no planeamento da análise estatística dos resultados do ensaio clínico inerente a esta dissertação.

À Brigada Cinotécnica da Guarda Nacional Republicana, especialmente ao Capitão Veterinário Hugo Rocha, pela colaboração e disponibilidade para a realização de um estudo piloto que fez parte do processo de transposição da técnica de Choukroun para a Medicina Veterinária.

À Vacuette Portugal, com um agradecimento especial à Delegada Márcia Carvalho, pelo apoio incansável e sempre profissional, na cedência tanto de imagens como de amostras de material.

A todos os docentes da FMV-UL, pelo seu contributo inestimável na minha formação, assim como a todos os técnicos e administrativos, alguns dos quais tomando parte na elaboração desta dissertação, a todos, pela sua importância, um agradecimento especial.

A todos os meus amigos (colegas e não só), que felizmente são mais do que os que me é possível enumerar, pelo apoio e amizade durante todo o curso. A toda a minha família, pelo apoio e amizade.

Comparação da utilização exclusiva de osso esponjoso autólogo com a utilização mista de osso esponjoso autólogo e fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) na cicatrização do espaço criado pela osteotomia realizada na técnica de *tibial tuberosity advancement* (TTA)

RESUMO

A necessidade da criação de alternativas para os actuais métodos cirúrgicos de enxerto, tanto em ortopedia como em cirurgia de tecidos moles, tem levado a Medicina a investigar possíveis substitutos para os actuais protocolos disponíveis. Nesse âmbito, a fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) tem merecido especial atenção. Este trabalho tem por objectivo a experimentação de manipulados de L-PRF como método de enxerto em animais de companhia.

O grupo de teste era constituído por 9 cães com diagnóstico definitivo de ruptura de ligamento cruzado, nos quais foi aplicado L-PRF em conjunto com osso esponjoso autólogo para preenchimento da osteotomia criada pelo método de *tibial tuberosity advancement* (TTA). Os pacientes foram sujeitos a um controlo radiográfico, complementado por um estudo histológico dos coágulos de L-PRF, assim como pela realização de um inquérito realizado aos donos dos animais.

Os resultados do controlo radiográfico do grupo de teste foram comparados com as radiografias de seguimento do grupo controlo, constituído por 8 animais cuja osteotomia de TTA tinha sido preenchida apenas por osso esponjoso autólogo. Registou-se uma diferença não estatisticamente relevante na utilização de L-PRF, com efeito benéfico na velocidade de ossificação até às 8 semanas de pós-operatório. Contudo, mais estudos, com uma amostra de maiores dimensões, serão necessários para validar esta conclusão.

PALAVRAS-CHAVE: L-PRF, cães, TTA

Comparison between autologous cancellous bone and a mixture of autologous cancellous bone and leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) as grafting materials for tibial tuberosity advancement's osteotomy

ABSTRACT

The need for alternatives to current grafting protocols in Soft Tissue and Orthopedic surgery has led to abundant research on the subject. Leucocyte and platelet-rich fibrin (L-PRF) has deserved special attention. This study aims to validate the use of L-PRF as a grafting material for Small Animal Surgery.

9 dogs diagnosed with cranial cruciate ligament rupture at the time of this study were enrolled and L-PRF applied in association with autologous cancellous bone and used as filling materials for the TTA's osteotomy gap. Control radiographs and owner's surveys were used for follow-up. In addition, L-PRF clots underwent histological evaluation.

8 dogs on which the osteotomy gap was filled with autologous cancellous bone only were used as control. A radiographic scoring system was used to compare ossification between follow-up radiographies from both groups. Test Results, although not statistically significant, have shown a potential benefit after the use of L-PRF as a grafting material. However, further studies, with larger samples, would be needed to confirm this hypothesis.

Keywords: L-PRF, dogs, TTA

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	IX
ÍNDICE GERAL	XI
ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES.....	XII
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	XIII
ÍNDICE DE TABELAS	XIII
1. Relatório do período de estágio.....	1
2. A utilização de concentrados de plaquetas	4
2.1. Conceitos subjacentes à sua utilização	4
2.2. Evolução da produção de concentrados de plaquetas e actual classificação	7
3. Fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF): o protocolo de Choukroun	10
3.1. L-PRF: estudos <i>in vitro</i>	16
3.2. L-PRF: estudos <i>in vivo</i>	24
3.3. Utilização de concentrados de plaquetas na ossificação de ossos longos.....	30
4. A <i>Tibial Tuberosity Advancement</i> (TTA) como modelo para osteogénese	33
5. A cicatrização óssea por segunda intenção	35
6. Ensaio clínico	37
6.1. Material e métodos	37
6.1.1. Critérios de inclusão de casos	37
6.1.2. Procedimento de preparação e implantação do L-PRF	38
6.1.3. Estudo radiográfico.....	43
6.1.4. Estudo histológico dos coágulos de L-PRF	44
6.1.5. Questionário	44
6.1.6. Análise matemática dos resultados obtidos no estudo radiológico.....	45
7. Resultados.....	47
7.1. População em estudo	47
7.2. Estudo radiográfico	48
7.3. Estudo histológico.....	51
8. Discussão.....	53
8.1. Análise às críticas publicadas sobre concentrados de plaquetas em sentido lato e ao protocolo de Choukroun especificamente.....	53
8.2. O L-PRF como alternativa aos materiais de enxerto disponíveis em Ortopedia	58
8.3. Análise ao ensaio clínico	63
9. Conclusão.....	67
10. Bibliografia	68
11. Anexos	73

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1 – esquematização das fases produção de concentrados de plaquetas (ilustração original; adaptado de Ehrenfest et al., 2010)	8
Ilustração 2 – representação do produto obtido pela técnica de Choukroun (ilustração original; adaptado de Ehrenfest et al., 2010)	9
Ilustração 3 – sistema de colheita estéril Vacuette® (fotografia original)	39
Ilustração 4 – Pormenor da borboleta Vacuette® com adaptador luer (fotografia original) ...	39
Ilustração 5 – Pormenor do adaptador <i>holder</i> Vacuette® (fotografia original)	39
Ilustração 6 – tubo de vácuo para soro (vermelho/preto) Vacuette® (fotografia gentilmente cedida pela Vacuette Portugal).....	40
Ilustração 7 – incisão na face medial do membro posterior (fotografia original)	40
Ilustração 8 – acesso ao espaço articular (fotografia original)	40
Ilustração 9 – desbridamento e exposição da crista da tibia (fotografia original)	41
Ilustração 10 – início da realização da osteotomia (fotografia original).....	41
Ilustração 11 – fixação da osteotomia com placa e caixa (fotografia original)	41
Ilustração 12 – osteotomia fixada e preenchida (fotografia original)	42
Ilustração 13 – tubos de soro contendo L-PRF, após centrifugação (fotografia original)	42
Ilustração 14 – coágulos de L-PRF em placa de Petri após extracção do tubo (fotografia original).....	42
Ilustração 15 – corte dos coágulos para posterior mistura com osso esponjoso autólogo (fotografia original)	43
Ilustração 16 - posterior mistura com osso esponjoso autólogo (fotografia original)	43
Ilustração 17 – Corte histológico de um dos coágulos, corado pelo tricrómio de Masson, com ampliações de 40 e de 200 X (fotografia original).....	51
Ilustração 18 - Pormenor de um corte histológico de um dos coágulos, correspondendo à camada flogística, contendo abundante quantidade de glóbulos brancos e plaquetas. Coloração de Hematoxilina e Eosina, numa ampliação de 200 X.....	52
Ilustração 19 – Pormenor de um corte histológico de um dos coágulos, correspondendo à camada flogística, corado com a coloração de Hematoxilina e Eosina, numa ampliação de 200 X (fotografia original).	52

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição percentual das horas de estágio pelas diversas áreas clínicas	1
Gráfico 2 – Número de horas dedicado a cada área clínica	1
Gráfico 3 – Comparação entre a classificação obtida pelas radiografias de controlo do Grupo Controlo e do Grupo de Teste, das 4 semanas de pós-operatório, atribuídas pelo Operador A.....	48
Gráfico 4 – Comparação entre a classificação obtida pelas radiografias de controlo do Grupo Controlo e do Grupo de Teste, das 8 semanas de pós-operatório, atribuídas pelo Operador A.....	48
Gráfico 5 – Comparação entre a classificação obtida pelas radiografias de controlo do Grupo Controlo e do Grupo de Teste, das 12 semanas de pós-operatório, atribuídas pelo Operador A.....	49
Gráfico 6 – Comparação entre a classificação obtida pelas radiografias de controlo do Grupo Controlo e do Grupo de Teste, das 4 semanas de pós-operatório, atribuídas pelo Operador B.....	49
Gráfico 7 – Comparação entre a classificação obtida pelas radiografias de controlo do Grupo Controlo e do Grupo de Teste, das 8 semanas de pós-operatório, atribuídas pelo Operador B.....	49
Gráfico 8 – Comparação entre a classificação obtida pelas radiografias de controlo do Grupo Controlo e do Grupo de Teste, das 12 semanas de pós-operatório, atribuídas pelo Operador B.....	50

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Conteúdo proteico dos grânulos α subdividido em categorias por função (adaptado de Nurden et al. 2008; tradução livre)	5
Tabela 2 – Relação entre as fases da ossificação endocondral e diversos factores de crescimento (adaptado de Malhorta et al., 2013; tradução livre).	36
Tabela 3 – Caracterização demográfica e da técnica cirúrgica envolvida na abordagem ao Grupo de Teste.....	47
Tabela 4 – Caracterização demográfica e da técnica cirúrgica envolvida na abordagem ao Grupo Controlo	47

1. RELATÓRIO DO PERÍODO DE ESTÁGIO

O presente ensaio clínico baseia-se no trabalho desenvolvido durante o período de estágio curricular, levado a cabo no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (HE-FMV), sob orientação do Professor Doutor António Ferreira. O mesmo estágio decorreu entre o dia 5 de Novembro de 2012 e o dia 1 de Junho de 2013. Esse período incluiu um estágio de 3 semanas no Hospital para Pequenos Animais da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Glasgow, que teve lugar de 25 de Março a 13 de Abril de 2013.

O tempo de estágio decorrido no HE-FMV foi repartido entre as áreas clínicas de Internamento, Medicina Interna, Cirurgia e Imagiologia, num total de 1200 horas (excluindo tempo adicional não previsto no horário mensal).

Gráfico 1 – Distribuição percentual das horas de estágio pelas diversas áreas clínicas

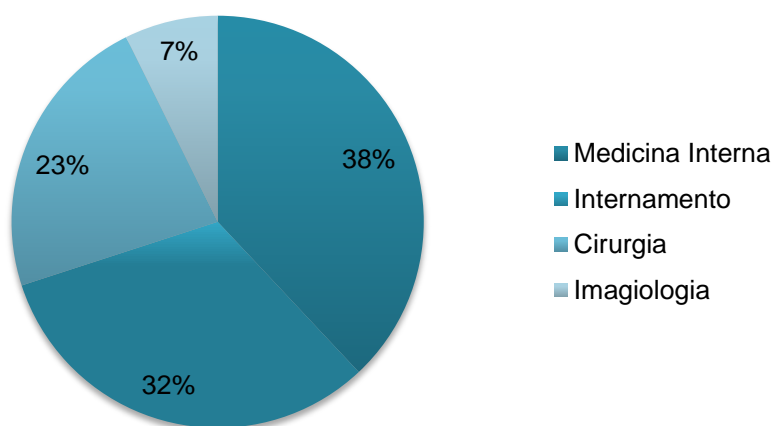
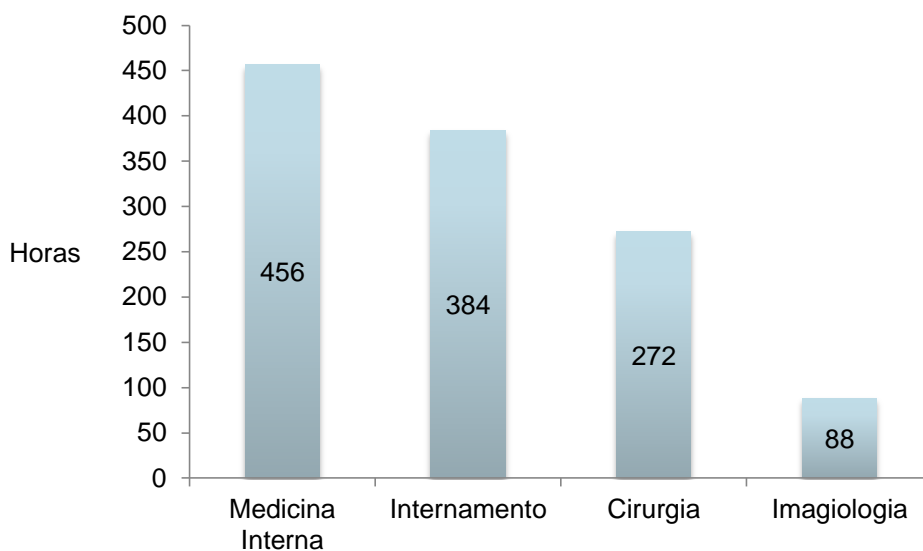


Gráfico 2 – Número de horas dedicado a cada área clínica



No âmbito da Medicina Interna, à qual foi dedicado quase 40% do tempo de estágio, era pedido que se conduzissem consultas, recolhendo-se a história pregressa, realizando-se o exame físico e auxiliando nos procedimentos primordiais de tratamento e diagnóstico. Especificamente, era esperada colaboração nas recolhas de sangue (das veias cefálica, jugular e safena em cães e jugular, cefálica e femoral em gatos), na realização de microhematócritos, electrocardiogramas, análises de sedimento urinário, punções aspirativas com agulha fina (PAAF), esfregaços de sangue e do conteúdo obtido pelas PAAF's, colheita e coloração de amostras obtidas com recurso a zaragatoas (por exemplo, do pavilhão auricular e canal auditivo externo), medições de glicémia e uso do refractómetro nas suas aplicações várias, utilização de vários *kits* rápidos de diagnóstico (como os utilizados para mensuração da Lipase Pancreática Específica do Cão [cPLI] ou do Gato [fPLI]) e colocação e manutenção de catéteres intravenosos, associando fluidoterapia ou infusões a ritmo constante (*constante-rate infusions* [CRI]).

Foi possível também acompanhar e por vezes conduzir a realização de vários procedimentos mais invasivos, como sendo a algaliação de cães, cadelas ou gatos, a colocação de drenos torácicos, de cateteres venosos centrais, de tubos esofágicos, drenagens torácicas, cistocentese e a realização de vários pensos de pele e ortopédicos (de Robert-Jones).

Foram também seguidas várias consultas de especialidade, nomeadamente nas áreas de Dermatologia (com execução de esfregaços por aposição ou pela técnica de “fita-cola”, biópsias cutâneas com recurso a biótomos e antecedentes de anestesia local, observação de testes intradérmicos e condução de imunoterapia, entre outras técnicas de diagnóstico), de Oncologia (acompanhando sessões de quimioterapia), de Endocrinologia (acompanhando várias provas de diagnóstico, citando-se a título de exemplo os testes de supressão com dose baixa de dexametasona, as curvas de glicémia e variados doseamentos hormonais) de Oftalmologia (incluindo exames de fundo do olho, electrorretinografias, testes de Schirmer e de fluoresceína) assim como de Neurologia e de animais exóticos (durante as quais se acompanharam várias espécies de Psitacídeos e outros Passeriformes, Quelónios, Roedores e Leporídeos, de Furões como únicos representantes dos mustelídeos e ocasionalmente de Marsupiais).

O trabalho de Internamento era muitas vezes sobreponível com o realizado em Medicina Interna. Era função dos estagiários fazer as medicações e assegurar as alimentações dos animais internados, monitorizando de perto animais em estado crítico, em câmaras de concentração de oxigénio, com sistemas fechados de colheita de urina ou com alimentações forçadas e/ou parentéricas, assim como dos isolados por suspeita ou diagnóstico de doenças infecto-contagiosas e/ou zoonóticas.

Na área de cirurgia, as funções eram rotativamente as de Cirurgião Assistente, Anestesta e de Circulante. Foi dada igual importância às áreas de cirurgia de Tecidos Moles,

Dentisteria, Cirurgia Oftálmica, Neurocirurgia e Ortopedia. Na vertente de tecidos moles, realizaram-se mais comumente as castrações, ovariectomias, (estas duas também realizadas em Coelho, Porquinhos da Índia e Furões) mastectomias, exérese de nódulos e as plastias de soluções de continuidade. Adicionalmente, acompanharam-se cistotomias, biópsias intestinais, hepáticas e renais, colecistectomias, enterotomias e enterectomias, esplenectomias, pilorotomias, resolução de hérnias perineais, peritoneopericárdicas e inguinais, enxertos cutâneos rotacionais e uma laqueação de ducto arterioso patente e uma vulvoplastia.

Em Ortopedia, foram feitas inúmeras osteossínteses com recurso a placas (bloqueadas e não-bloqueadas) e parafusos, fixadores externos e cavilhas intramedulares, de mandíbula, vertebrais, de rádio e ulna, de úmero, de fémur, tibia e fíbula, de metatarsos e de bacia. Foram ainda realizados avançamentos da tuberosidade tibial (*tibial tuberosity advancements* ([TTA's]), panartrodeses do carpo; trocleoplastia, sutura de imbricamento e transposição de crista da tibia para resolução de luxação patelar, uma tenectomia bilateral da articulação carpo-metacárpica e uma hemimandibulectomia.

Em neurocirurgia conduziram-se essencialmente hemilaminectomias e *ventral-slots*, acompanhadas ou não de técnicas de distração-fusão, enquanto em Cirurgia Oftálmica se observaram facoemulsificações, exérese de nódulos palpebrais e de cílios ectópicos, plastias para resolução de entrópion e ectrópion e por fim, a evisceração com colocação de prótese intraesclerar e a enucleação. No campo da Dentisteria foram conduzidas maioritariamente extracções dentárias e destartarizações, com anestesia geral e apenas uma vez com anestesia local.

Por último, no campo da Imagiologia, acompanhou-se a realização de inúmeras projecções radiográficas, de mielografias, de tomografias axiais computadorizadas (TAC's), com e sem contraste, de punções TAC-guiadas, assim como a realização de uma fluoroscopia para diagnóstico de megaesófago. Ao dispor do HE-FMV está também a ecografia, o que permitiu o acompanhamento de várias ecografias, predominantemente ecografias abdominais e ecocardiografias, assim como de biópsias, cistocenteses e uma pericardiocentese eco-guiadas.

Em todos os serviços hospitalares percorridos, era esperada e exigida a aprendizagem dos vários procedimentos e protocolos, assim como o desenvolvimento de autonomia técnica e intelectual em todas as actividades clínicas.

2. A UTILIZAÇÃO DE CONCENTRADOS DE PLAQUETAS

2.1. Conceitos subjacentes à sua utilização

A cicatrização e regeneração dos tecidos moles e musculoesquelético são mediadas por vários mecanismos celulares e moleculares (Fossum et al., 2007). Embora o processo de cicatrização tecidular ainda necessite de ser aprofundado, a Ciência conhece hoje o papel e preponderância não só de várias linhas celulares como também de múltiplas citocinas e factores de crescimento. Neste âmbito, as plaquetas têm merecido especial atenção.

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados, sendo o megacariócito a célula medular progenitora, que persistem 7 a 10 dias em circulação e tendo um papel crucial na hemostase primária, actuando por adesão e agregação e criando assim uma superfície de procoagulação que leva à formação de trombina e por consequência, de fibrina (A. Nurden, P. Nurden, Sanchez, Andia & Anitua, 2008). As plaquetas apresentam inúmeros grânulos, algumas mitocôndrias e dois sistemas canaliculares evidentes, o sistema tubular denso e o sistema tubular que está ligado à superfície plaquetária. As plaquetas contêm três tipos de grânulos secretores: os grânulos α , os grânulos densos e os lisossomas (Malhotra, Pelletier, Yu & Walsh, 2013). Os grânulos plaquetários mais abundantes são os grânulos α , perfazendo cerca de 10% do volume plaquetário. Os grânulos α são vesículas de forma oval ou esférica, que por sua vez formam aglomerados em unidades membranárias maiores e que armazenam em si variadíssimas proteínas com múltiplas funções (Prakash & Thakur, 2011). Os grânulos densos libertam substâncias pro-agregantes como a serotonina (Dohan et al., 2006), o cálcio ou a adenosina trifosfato e os lisossomas contêm essencialmente proteases (Malhotra et al., 2013). Quando ocorre a desgranulação, estes grânulos libertam centenas de proteínas para o espaço extracelular, podendo também essas proteínas ser expressas como proteínas membranárias da superfície plaquetária. Essas proteínas, quando activadas, ligar-se-ão às células alvo em receptores específicos, despoletando vias de sinalização intracelular que resultam na manipulação da expressão genética dessas mesmas células. Por sua vez, essa manipulação vai conduzir a alterações em processos tais como a inflamação, a angiogénese, a resposta imunitária (Nurden et al., 2008), a proliferação celular, a síntese de colagénio, a produção de tecido osteóide, entre outros (Prakash & Thakur, 2011).

A complexidade destes processos ultrapassa em larga escala o objectivo desta dissertação, pretendendo-se apenas enfatizar a extrema relevância das plaquetas e do seu conteúdo proteico nos processos celulares de hemostase, cicatrização e regeneração de tecidos em que intervêm. A tabela 1 apresenta, de forma breve e sucinta, algumas das proteínas mais relevantes contidas nos grânulos α .

Tabela 1 – Conteúdo proteico dos grânulos α subdividido em categorias por função (adaptado de Nurden et al. 2008; tradução livre)

Categoria	Proteínas	Função
Proteínas de adesão	VWF + pro-péptido, Fibronectina, Vitronectina, Fibrinogénio, TSP-1, laminina-8, SCUBE-1	Interações por contacto entre células, hemostase e coagulação. Composição da matriz extracelular
Factores de coagulação e proteínas associadas	Factor V/Va, Factor XI-like protein, multimerina, proteína S, Quininogénio de elevado peso molecular, inibidor da via do factor tecidual	Produção de trombina e a sua regulação
Factores fibrinolíticos e proteínas associadas	Plasminogénio, PAI-I, u-PA, α 2-antiplasmina, glicoproteína rica em histidina, TAFI, α 2-macroglobulina	Produção de plasmina e modelação vascular
Proteases e anti-proteases	TIMPs 1-4, metaloprotease-1, -2, -4, -9, ADAMTS13, TACE, inibidor plaquetário da FIX, protease nexina-2, C1 inibidor, inibidor da protease serpina 8, α 1-antitripsina	Angiogénese, modelação vascular, regulação da coagulação, regulação do comportamento celular
Factores de crescimento	PDGF, <i>transforming growth factor</i> β 1 (TGF- β 1) e β 2, factor de crescimento da epiderme (EGF), <i>insulin-like growth factor</i> (IGF-1), factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF) A e C, bFGF (FGF-2), HGF, BMP-2, -4, -6, CTGF	Quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular
Quimiotácticos, Citoquinas e outros	RANTES, IL-8, MIP-1 α , ENA-78, MCP-3, GRO- α , angiopoietina-1, IGF-BP3, IL-6sR, PF4, β -TG, proteína básica plaquetária, NAP-2, péptido activador do tecido conjuntivo III, HMGB1, FasL, LIGHT, TRAIL, SDF-1 α , endostatinas, osteonectina, sialoproteína óssea	Regulação da angiogénese, modelação vascular, interações celulares e formação de tecido ósseo
Proteínas anti-microbianas	trombocidinas	Propriedades bactericidas e fungicidas
Outros	Sulfato de Condroitina-4, albumina, imunoglobulinas, semaforina, 3 ^a , PrPc	
Glicoproteínas membranárias	α IIb β 3, α v β 3, GPIb, PECAM-1, constituintes da membrana plaquetária, receptores para agonistas primários, CD40L, factor tecidual, P-selectina, TLT-1	Adesão e agregação plaquetária, endocitose de proteínas, inflamação, formação de trombina, interações entre leucócitos e plaquetas

É também necessário sublinhar o relevo que a formação de fibrina assume no processo cicatricial. Richard A. F. Clark redigiu em 2001 um artigo revendo o papel da fibrina na cicatrização de feridas de pele, baseando-se nos vários avanços da Ciência nessa área, fundamentando a sua revisão com trabalhos publicados até então. O mesmo autor sublinhou que o coágulo de fibrina, que tem origem pela agregação plaquetária juntamente com as reacções de coagulação, actua como matriz para o recrutamento de células para o local onde se encontra a lesão nos tecidos. Mais concretamente, Clark (2001) menciona que a fibrina, juntamente com a fibronectina, actua como matriz provisória para o afluxo de monócitos, células endoteliais e fibroblastos, que usam as suas integrinas para estabelecerem ligações com a fibrina, fibronectina e vitronectina. Essa interacção das células com o coágulo altera o seu fenótipo e a sua expressão genética, alterando até a resposta das células às citoquinas circulantes. As propriedades físico-químicas da rede tridimensional de fibrina, assim como a presença de elementos quimiotácticos e de fibronectina, controlam a invasão do coágulo por parte dos macrófagos. Os próprios fibrinopéptidos que resultam da clivagem do fibrinogénio pela trombina (e que ocorrem sempre que se forma um coágulo) são factores quimiotácticos para os neutrófilos e monócitos. Os elementos desta matriz tecidual provisória caracterizam-se ainda por apresentarem baixa resistência à migração de células (ácido hialurónico), para além de constituírem um reservatório para uma série de factores de crescimento e citoquinas (fibrinogénio). Para a neovascularização, não só se releva o papel de factores de crescimento como o factor de crescimento endotelial vascular (VEGF), factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), entre outros, como também se provou ser fulcral a existência de uma matriz extracelular apropriada. Nesse sentido, Clark menciona que a fibrina estimula directamente a angiogénese. O autor conclui assim que a fibrina encerra em si pelo menos duas funções: a de constituir a matriz que permite a migração celular que sustenta a neovascularização e a capacidade de aprisionar factores quimiotácticos e/ou quimiocinéticos que levam à migração de células endoteliais para o interior do coágulo (Clark, 2001). As propriedades acima descritas fazem da fibrina um elemento essencial não só para a hemostase, que constitui o primeiro momento da cicatrização, como também das fases que se seguem à recuperação estrutural e funcional dos tecidos lesados.

A partir do momento em que a Medicina reconheceu a importância e influência das plaquetas, dos seus produtos de secreção e dos agregados que estas formam na cicatrização e regeneração de tecidos, deu-se início a um longo processo de tentativa de manipulação destes elementos, com o propósito de melhorar, modelar, acelerar e aumentar a cicatrização de tecidos.

2.2. Evolução da produção de concentrados de plaquetas e actual classificação

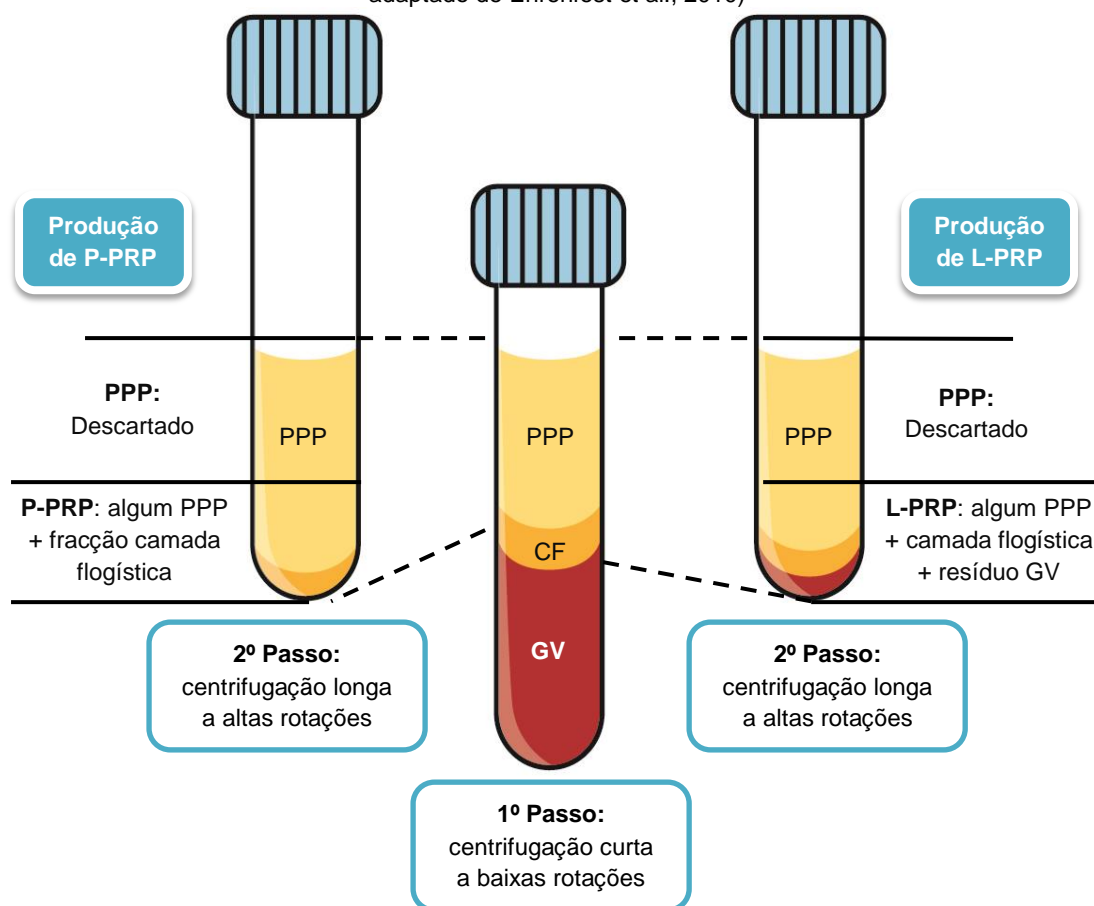
A produção de concentrados de plaquetas surge pela primeira vez, no âmbito da Medicina Transfusional, para colmatar trombocitopénias graves causadas por exemplo por perdas de sangue acentuadas em tempo cirúrgico, aplasias medulares ou leucemia aguda (Ehrenfest, Rasmussen & Albrektsson, 2008). A aplicação de produtos derivados do sangue para fins de cicatrização de tecidos surge mais tardiamente, sendo que os primeiros selantes cirúrgicos à base de fibrina foram pela primeira vez comercializados na Europa no final dos anos 70. Estes produtos pretendiam mimetizar os estágios finais da coagulação e foram sendo usados para hemostase, como selantes de tecidos e como agregantes de materiais de enxerto ósseos (Prakash & Thakur, 2011).

Posteriormente, investigadores procuraram aliar as propriedades da fibrina aos factores de crescimento de libertação plaquetária, numa tentativa de encontrar o sistema ideal para a deposição de factores de crescimento no local da lesão. O princípio motor desta utilização das plaquetas com vista à obtenção dos seus factores de crescimento assenta, mais uma vez, no reconhecimento da importância desses mesmos factores na cicatrização e regeneração de tecidos moles e duros (Prakash & Thakur, 2011). Surgem então os primeiros concentrados de plaquetas visando substituir os derivados de fibrina, concentrados esses que conheceram no presente século um desenvolvimento exponencial (Ehrenfest, 2008).

A maioria destes produtos foi englobada sob a designação de Plasma Rico em Plaquetas (PRP). Embora esta nomenclatura não permita a distinção entre os vários tipos de protocolo e sistemas de colheita, todas estas técnicas partilham algumas características comuns (ilustração 1). Segundo esses mesmos protocolos, o sangue é colhido para recipientes com anticoagulante pré-cirurgicamente e imediatamente processado por centrifugação, sendo a duração da totalidade do processo geralmente inferior a uma hora. A primeira centrifugação a que o sangue é sujeito tem por objectivo a separação do sangue em três camadas. Na base encontram-se os glóbulos vermelhos, a meio do recipiente deposita-se a camada flogística (onde se encontram a maioria das plaquetas e dos leucócitos) e no topo acumula-se um sobrenadante acelular a que se dá o nome de Plasma Pobre em Plaquetas (PPP). O passo seguinte, embora os processos variem de protocolo para protocolo, consiste na tentativa de separação dos glóbulos vermelhos e do PPP para que finalmente se recolha a camada flogística. Esta é depois aplicada no local desejado, após a adição de trombina e/ou cloreto de cálcio para que se consiga a pretendida activação plaquetária e polimerização de fibrina (Ehrenfest, 2008). Em 2009, o mercado dos concentrados de plaquetas foi avaliado em 45 milhões de dólares, estimando-se que esse valor suba para os 120 milhões de dólares até 2016 (Dhillon, Schwartz & Maloney, 2012).

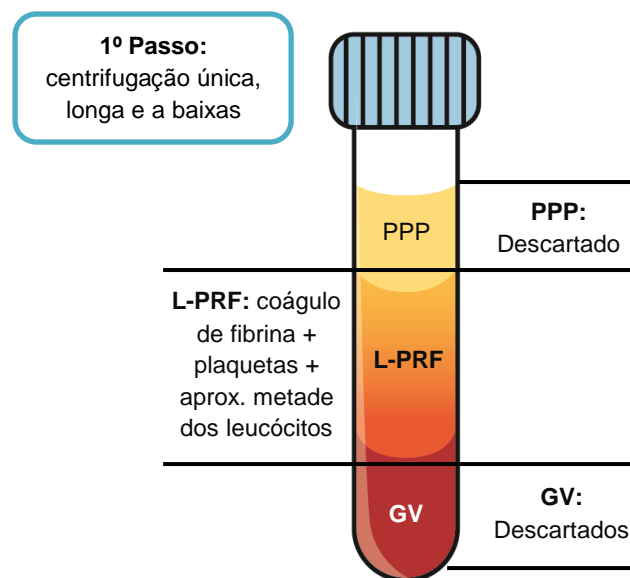
Recentemente, foi desenvolvido um outro método de concentração de plaquetas por um anestesista francês chamado Joseph Choukroun, considerado por muitos como o método mais promissor para variadíssimas aplicações. Segundo este protocolo, o sangue é colhido sem qualquer tipo de anticoagulante e imediatamente centrifugado (ilustração 2). A coagulação que assim ocorre é completamente natural e permite a obtenção fácil de um coágulo de Fibrina Rico em Plaquetas e Leucócitos (L-PRF). Este coágulo é obtido sem qualquer manipulação bioquímica do sangue, contrariamente ao que acontecia com protocolos anteriores. Concomitantemente, esta técnica é também a mais simples e mais barata para obtenção de um concentrado de plaquetas (Ehrenfest et al., 2008).

Ilustração 1 – esquematização das fases de produção de concentrados de plaquetas (ilustração original; adaptado de Ehrenfest et al., 2010)



PPP: plasma pobre em plaquetas; CF: camada flogística; GV: glóbulos vermelhos; P-PRP: plasma rico em plaquetas puro; L-PRP: plasma rico em plaquetas e leucócitos

Ilustração 2 – representação do produto obtido pela técnica de Choukroun (ilustração original; adaptado de Ehrenfest et al., 2010)



PPP: plasma pobre em plaquetas; GV: glóbulos vermelhos; L-PRF: fibrina rica em plaquetas e leucócitos

Numa tentativa de exercer uma distinção entre os múltiplos protocolos existentes hoje em dia para a produção de concentrados de plaquetas, Ehrenfest, Rasmusson e Albrektsson sugeriram, em 2008, um método para classificação dos incontáveis protocolos disponíveis actualmente. Para além de abranger pormenores técnicos sobre a parte prática da preparação (como o tamanho da centrífuga necessária, o custo dos vários consumíveis e materiais e duração do procedimento), esta classificação subdivide os concentrados em função do seu conteúdo plaquetário e leucocitário (assim como volume final obtido e preservação do conteúdo celular) e do seu conteúdo de fibrina (pela sua densidade e grau de polimerização). Assim, é possível agrupar os concentrados de plaquetas em quatro categorias principais: plasma rico em plaquetas puro (P-PRP), plasma rico em plaquetas e leucócitos (L-PRP), fibrina rica em plaquetas pura (P-PRF) e fibrina rica em leucócitos e plaquetas (L-PRF). Os dois primeiros diferenciam-se dos dois últimos não merecendo a designação de “fibrina” porque, embora esta também sofra polimerização, a densidade da malha de fibrina obtida é baixa e a polimerização fraca (Ehrenfest et al, 2008).

O mesmo trabalho por Ehrenfest, Rasmusson e Albrektsson (2008) enuncia claramente as vantagens do método de L-PRF de Choukroun. A centrífuga necessária é leve (qualquer centrífuga pequena de bancada preenche os requisitos técnicos), o protocolo é rápido, o custo associado é baixo e o conjunto de materiais especialmente ergonómico quando comparado com o material de processos análogos. O volume final de L-PRF obtido é grande e constante o que potencia várias aplicações, a captação de plaquetas é excelente e a de leucócitos é boa, registando ainda que as células reunidas no coágulo estão no estado activado mas não se encontram danificadas pelo processo de activação. Relativamente à malha de fibrina obtida, a polimerização lenta e natural que é levada a cabo pela

centrifugação, permite que se estabeleça uma rede de fibrina flexível que é simultaneamente capaz de suportar a retenção de factores de crescimento e de permitir a migração celular.

Por todas as características acima descritas, o L-PRF afigura-se como um dos concentrados de plaquetas de maior utilidade para a Medicina moderna. Adicionalmente, a sua facilidade de obtenção e o baixo custo monetário associado tornam este protocolo o método de eleição para uso veterinário. Decidiu-se por isso, no âmbito do trabalho prático que esta dissertação implicou, tentar aplicar este protocolo pela primeira vez em Clínica de Animais de Companhia, não estando descrita na bibliografia nenhuma aplicação prévia em Cães.

3. FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E LEUCÓCITOS (L-PRF): O PROTOCOLO DE CHOUKROUN

Esta técnica foi inicialmente desenvolvida para posterior utilização em cirurgia oral e maxilofacial. O protocolo é extremamente simples: o sangue é colhido, em sistema de vácuo, para tubos de 10 ml sem anticoagulante (tubos de plástico com revestimento interno de sílica ou tubos de vidro) e imediatamente centrifugado após colheita a 700¹ g durante 10 minutos (Dohan et al., 2006a).

A ausência de anticoagulante leva à activação das plaquetas pelo contacto com as paredes do tubo, contacto esse que despoleta a cascata da coagulação. A centrifugação leva à concentração do fibrinogénio na parte superior do tubo, onde depois é convertida em fibrina pela trombina circulante. É assim obtido um coágulo de fibrina a meio do tubo, no topo de uma camada de glóbulos vermelhos e abaixo de uma camada de sobrenadante (mais concretamente constituída por plasma acelular). As plaquetas e os leucócitos ficam então aprisionados no último terço do coágulo de fibrina. Na verdade, a formação de um coágulo de fibrina, que segundo o modelo da cascata de coagulação é o produto final dessa mesma cadeia de reacções, numa zona do tubo em que não se encontram plaquetas, poderá ser explicada pelo novo modelo de coagulação actualmente em discussão, denominado modelo celular (*cell-based model*). Esta teoria é sustentada por várias observações *in vivo*, uma das quais a constatação de que a formação do trombo plaquetário e a polimerização de fibrina acontecem em simultâneo no processo de coagulação (McMichael, 2012). Segundo o modelo da cascata de coagulação, comumente aceite, a activação plaquetária aconteceria primeiro e só então aconteceria a subsequente formação do coágulo de fibrina para estabilização do agregado plaquetário.

¹ Contrariamente ao indicado no trabalho de Ehrenfest et al. (2006) e após ter sido estabelecido o contacto com o Dr. Joseph Choukroun, foi sugerido que haveria um erro no cálculo da força g a utilizar que se indicou nesse mesmo artigo e que a força centrífuga realmente utilizada seriam 700 g.

O segredo para a realização bem-sucedida da técnica de Choukroun assenta inteiramente na velocidade de transferência do sangue após a colheita para a centrifuga. A ausência de anticoagulante conduz a que o sangue coagule quase imediatamente quando entra em contacto com o revestimento interno do tubo, sendo necessários apenas alguns minutos para que a centrifugação concentre a meio do tubo o fibrinogénio. Assim se percebe que apenas uma colheita rápida e uma manipulação igualmente rápida dos tubos permitem a obtenção de um coágulo com utilidade cirúrgica. Se houver um atraso entre a colheita do sangue e a centrifugação, a fibrina vai polimerizar numa maneira difusa e o coágulo final será pequeno e de consistência demasiado branda (Dohan et al., 2006a).

Esta polimerização lenta da fibrina no tubo é um dos factores que diferencia este concentrado de plaquetas dos restantes existentes. Ao contrário do que acontece com outras técnicas, em que há adição de grandes quantidades de trombina exógena para que a coagulação aconteça, o protocolo de Choukroun implica uma coagulação com concentrações de trombina praticamente fisiológicas, o que influencia drasticamente a estrutura tridimensional da malha de fibrina obtida. As fibrilhas de fibrina podem estruturar-se de duas maneiras distintas: de uma forma tetramolecular condensada (com junções bilaterais) ou de uma forma trimolecular (com junções equilaterais). As junções bilaterais formam-se na presença de grandes concentrações de trombina, o que por sua vez gera uma rede de fibrina muito rígida que não permite uma infiltração por factores de crescimento ou outras moléculas nem facilita a invasão celular que se pretende. Por outro lado, quando as ligações entre fibrilhas de fibrina são maioritariamente equilaterais, a rede formada é fina, elástica e flexível, suportando a infiltração por factores de crescimento e células. Estas características fazem do PRF um adjuvante muito útil na cicatrização tecidual, ao possibilitar a retenção de moléculas solúveis e favorecer a migração celular (Dohan et al., 2006b).

Tornou-se assim preponderante a compreensão dos fenómenos bioquímicos que ocorrem neste material biológico após a sua formação, sendo de sublinhar a importância da quantificação de citocinas e factores de crescimento no coágulo. Dohan et al. (2006b) num primeiro estudo propuseram-se a dosear dois tipos de citocinas plaquetárias fundamentais para a estimulação da migração e proliferação celular (particularmente as PDGF's²), para a remodelação da matriz de fibrina assim como para a secreção da matriz cicatricial de colagénio (nomeadamente o TGFβ³). Decidiram então dosear duas isoformas destas citocinas (PDGF-BB e TGFβ-1, respectivamente) e dosear ainda uma terceira família de moléculas, os *Insulin-Like Growth Factors* (doseando a isoforma IGF-I) pela importância que têm na proliferação e diferenciação da maior parte dos tipos celulares, conferindo também protecção contra os fenómenos apoptóticos. Após produção de vários coágulos, foram

² Platelet-derived Growth Factors

³ Transforming Growth Factor β

recolhidos individualmente os sobrenadantes (PPP) de cada tubo aos quais se associaram os exsudados obtidos dos coágulos depois de estes terem sido deixados 10 minutos a exsudar num recipiente de metal estéril. Os resultados mostraram não só que as concentrações de citocinas no PPP de cada tubo eram equivalentes ao do exsudado do coágulo correspondente, como também eram significativamente inferiores às concentrações obtidas com diferentes protocolos de PRP. Foi então possível concluir que, no L-PRF, a maior parte dos factores de crescimento fica aprisionada na rede de fibrina. Estas citocinas são moléculas de dimensões reduzidas, o que implicaria que após centrifugação ficariam concentradas na parte superior do tubo, o que após doseamento do PPP, se verifica que não acontece. Ao não terem sido encontradas tanto no PPP como no exsudado do coágulo, depreende-se que as citocinas devam estar intimamente ligadas à malha de fibrina, tão pouco sendo arrastadas pela exsudação. Por outro lado, a IGF-I sendo uma molécula plasmática é maioritariamente concentrada na parte superior do tubo, onde existe em concentrações elevadas principalmente quando comparando com as concentrações obtidas pelos métodos de PRP, em que o PPP (onde as IGF's são mais abundantes) é rejeitado pela maioria dos protocolos (Dohan et al., 2006b).

Assim se atesta a importância da polimerização lenta da rede de fibrina e a homogeneidade da rede obtida. Esta polimerização progressiva possibilita a incorporação de inúmeras citocinas na rede de fibrina, tornando-se estas intrínsecas à estrutura tridimensional. Este grau de ligação entre as citocinas e a fibrilha de fibrina garante uma maior longevidade das citocinas no local de aplicação, para além de resultar numa libertação faseada e mais fisiológica dessas moléculas (Dohan et al., 2006b).

Outra das características que os autores abordaram nesta primeira série de artigos descritivos foi a componente imunológica do L-PRF. Cada vez que, após uma agressão prévia aos tecidos, se inicia uma resposta inflamatória, há um afluxo de células inflamatórias ao local da lesão. Essa concentração de leucócitos tem por objectivo, não só contrariar o aparecimento de infecção, como também modelar a resposta inflamatória, recrutar fibroblastos para o estabelecimento de uma matriz cicatricial, induzir proliferação celular, estimular a biossíntese de proteínas estruturais e de proteases. Sublinha-se o papel de três citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e de duas citocinas cicatriciais (IL-4 e VEGF). A interleucina-1 β (IL-1 β) é produzida por macrófagos e neutrófilos activados, células endoteliais, fibroblastos, células de Langerhans e queratinócitos e a sua principal função é a estimulação dos linfócitos T *helper*. A interleucina 6 (IL-6) é principalmente produzida por monócitos, fibroblastos e células endoteliais mas também por macrófagos, linfócitos T e B, entre outros. A IL-6 é um factor de diferenciação para linfócitos B (estimulando a actividade humoral de maneira exuberante) e um activador de linfócitos T, sendo que na presença de IL-2 conduz à maturação de linfócitos T em linfócitos T citotóxicos. Como tal, a IL-6 reveste-se de um papel amplificador das reacções inflamatórias e de remodelação dos tecidos. O

factor de necrose tumoral α (TNF- α) é umas das primeiras citocinas libertadas por monócitos e macrófagos, neutrófilos e linfócitos T, como resposta à agressão bacteriana e na presença de endotoxinas bacterianas. Tem a função de activar os fibroblastos para que se inicie a remodelação dos tecidos, estimular a citotoxicidade e a fagocitose dos neutrófilos. A interleucina 4 (IL-4), produzida pelos linfócitos Th2 e CD4+, inibe as cascatas de reacções pró-inflamatórias, neutralizando também a sua amplificação. O factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é o promotor de crescimento vascular mais potente e ubiqüitário, com acção directa sobre a proliferação, migração, especialização ou mesmo sobrevivência das células endoteliais (Dohan et al., 2006c).

Dohan et al. (2006c) procuraram então dosear as citocinas acima enumeradas no PPP e no exsudado do L-PRF. Os resultados demonstraram que embora não houvesse diferenças significativas entre as concentrações obtidas no PPP e no exsudado, estas eram substancialmente maiores que as obtidas em amostras de plasma e soro dos mesmos dadores. Considerando que estas citocinas, no caso do L-PRF, só poderão ser de origem leucocítica, conclui-se que o processo de formação do L-PRF induz uma desgranulação leucocitária aumentada, por activação dos mesmos durante a centrifugação. Adicionalmente, é sugerido que, tal como acontece com as moléculas de secreção plaquetária, estas citocinas ficam aprisionadas na rede de fibrina. A excepção é representada pelo VEGF, cuja secreção plaquetária deu origem a concentrações mais elevadas no soro que no exsudado ou no PPP, sendo que as concentrações menores nestas duas amostras estão em concordância com a possibilidade de parte destas moléculas ficarem retidas na rede de fibrina. Face a estes resultados, os investigadores constataram que o L-PRF é também um biomaterial com atributos imunomoduladores, pela capacidade anti-infecciosa, propriedades quimiotácticas e angiogénicas.

Na quarta parte desta primeira série de artigos descritivos, Choukroun et al. (2006a) desenvolvem os efeitos biológicos benéficos da rede de fibrina formada no L-PRF. A fibrina e os produtos de degradação do fibrinogénio (FDP) estimulam a migração de neutrófilos e aumentam a expressão dos receptores membranários CD11c/CD18, que facilitam não só a migração dos neutrófilos através dos tecidos e permitem a adesão dos mesmos ao endotélio e às moléculas de fibrinogénio. Os FDP's estimulam ainda a fagocitose por parte dos neutrófilos e os processos de degradação enzimática. A fibronectina, em sinergismo com a fibrina e com os factores quimiotácticos que esta retém, estimula também a colonização de feridas pelos macrófagos. Os elementos que constituem os coágulos (fibrina, fibronectina, vitronectina e tenascina) são igualmente fundamentais para a migração de células epiteliais, por exemplo, no revestimento de soluções de continuidade cutâneas. A fibrina, fibronectina, PDGF e TGF- β são ainda essenciais para a regulação da expressão de integrinas, para a proliferação de fibroblastos e para a sua migração em feridas, ligando-se à rede de fibrina através de integrinas das quais a $\alpha v \beta 3$ será a principal. A fibrina constitui também a matriz

ideal para a fixação de células estaminais, pressupondo uma neovascularização eficaz antes (algo que é fomentado com a aplicação de L-PRF). As células estaminais requerem uma matriz provisória de fibrina e fibronectina para procederem à sua diferenciação inicial. É exactamente esse o princípio em que assenta a utilização de matrizes de fibrina enriquecidas com células estaminais, por exemplo, para cicatrização de defeitos ósseos. Todas estas características da fibrina sustentam a importância dos atributos do L-PRF e a relevância da sua rede de fibrina como factor adjuvante na cicatrização de tecidos.

Esta sequência de artigos introdutórios ao método de L-PRF culmina com um estudo *in vivo* comparativo entre a utilização mista de L-PRF e osso bovino liofilizado (FDBA) e exclusivamente FDBA para levantamento do seio maxilar, com o objectivo de aumentar a espessura de osso alveolar para posterior colocação de implantes dentários. Tendo em conta que o aumento do osso alveolar e a colocação dos implantes podem ocorrer em dois tempos cirúrgicos distintos, entre os quais o paciente permanece com um defeito na arcada dentária, uma das prioridades deste tipo de procedimento é o encurtamento do período entre cirurgias. Quanto mais célere for o ganho de espessura e densidade óssea do osso alveolar após levantamento do seio maxilar, mais rapidamente se procede à colocação dos implantes (o derradeiro objectivo de ambos os procedimentos). Foram realizados 6 levantamentos de seio maxilar com utilização mista de FDBA e L-PRF (grupo de teste) e 3 levantamentos de seio foram preenchidos com FDBA apenas (grupo de controlo). No grupo de teste a cirurgia para colocação dos implantes foi feita ao fim de 4 meses após levantamento do seio maxilar, sendo que no mesmo momento cirúrgico se colheram biópsias ósseas para análise histológica. Aos 4 meses pós levantamento de seio, não era possível colher-se tecido ósseo nos pacientes do grupo de controlo, o que conduziu a que as biópsias e a colocação dos implantes ocorressem apenas 8 meses após a primeira cirurgia. A análise das biópsias mostrou que o tecido ósseo neoformado no grupo de teste ao fim de 4 meses pós levantamento do seio maxilar era idêntico ao do grupo de controlo ao fim de 8 meses após esse mesmo procedimento. Embora não se deva sobrevalorizar os resultados de um estudo com uma amostra tão pequena, a adição de L-PRF nestes pacientes levou a que se conseguisse osso neoformado praticamente com as mesmas características que o obtido pela colocação exclusiva de FDBA, em metade do tempo requerido por este último. Sublinhando que este resultado carece de validade estatística, constituiu uma primeira indicação dos potenciais benefícios da utilização de L-PRF como material de enxerto na cicatrização óssea (Choukroun et al., 2006b).

Uma primeira descrição dos coágulos de L-PRF não ficaria completa sem um olhar aprofundado sobre a sua estrutura tridimensional. Reconhecendo a importância de uma descrição exaustiva do coágulo obtido com o protocolo de Choukroun, Ehrenfest, del Corso, Diss, Mouhyi e Charrier, publicaram em 2010 um estudo sobre a estrutura tridimensional e composição celular dos coágulos de L-PRF. Para além dos estudos qualitativos de

microscopia óptica e electrónica, os autores quantificaram ainda os conteúdos plaquetários e leucocitários da camada de glóbulos vermelhos, do sobrenadante (PPP) e do exsudado obtido do coágulo com ou sem compressão, solubilizados em conjunto. Os investigadores pretendiam assim quantificar a componente leucocitária e plaquetária dos coágulos e perceber se a compressão (que se utiliza para obter membranas de L-PRF, por oposição aos coágulos cilíndricos) influenciaria a composição do coágulo (Ehrenfest, del Corso, Diss, Mouhyi, Charrier, 2010)

As contagens plaquetárias demonstraram que praticamente não existiam plaquetas na camada de glóbulos vermelhos, exsudado e PPP, quando solubilizados e observados em conjunto. Tal resultado veio, uma vez mais, confirmar que a esmagadora maioria das plaquetas fica intimamente ligada à malha de fibrina que é obtida pela centrifugação de sangue contido num tubo sem anticoagulante. Mais relevante foi a constatação de que acima de metade dos leucócitos ficam também retidos na malha de fibrina, sendo principalmente representados por linfócitos (como se confirmou no mesmo estudo pela utilização de microscopia electrónica). Ficou assim demonstrado que a quantidade de leucócitos embebidos no L-PRF é significativa, sublinhando ainda o papel que os linfócitos têm como imunomoduladores. Esse estudo sublinha também a importância de um manuseamento cuidado dos coágulos para preservação da sua componente celular. A utilização de microscopia demonstrou também que a distribuição de plaquetas e leucócitos no coágulo não é uniforme, pelo que na sua maioria estes se depositam no último terço do coágulo de fibrina, principalmente na zona de contacto entre o coágulo e a camada de glóbulos vermelhos. Como tal, quando os operadores pretenderem utilizar coágulos de L-PRF, deverão preservar os primeiros milímetros de glóbulos vermelhos que se apresentam aderentes ao coágulo e desbridar os restantes de maneira suave, com vista a preservar o máximo de plaquetas e leucócitos. Esta noção é especialmente relevante para compreender qual deverá ser o método de manipulação dos coágulos e para que não se espere efeitos idênticos entre as duas extremidades dos coágulos. A malha de fibrina mostrou ser constituída por fibrilhas de fibrina organizadas de maneira linear e paralelas umas às outras, o que conduz a que, após compressão, a compactação perfeita das fibrilhas dê origem a uma malha muito densa e de difícil reabsorção por parte dos tecidos, algo que deve ser tido em conta de cada vez que se pretenda utilizar membranas de L-PRF (Ehrenfest et al., 2010a).

Os primeiros trabalhos sobre L-PRF demonstraram que este biomaterial se reveste de inúmeras características promissoras, principalmente quando feita a comparação com os restantes concentrados de plaquetas disponíveis actualmente. Os atributos comprovados destes coágulos (brevemente relatados neste primeiro segmento desta dissertação), aguçaram a vontade da comunidade científica no sentido de melhor se conhecerem as propriedades clínicas deste material. Seguiram-se então uma série de estudos *in vivo* e *in*

vitro que procuraram compreender e caracterizar melhor os efeitos do L-PRF, sugerindo ainda possíveis aplicações clínicas para o mesmo.

3.1. L-PRF: estudos *in vitro*

Um dos primeiros trabalhos sobre os efeitos de L-PRF em diferentes culturas primárias de células foi publicado em 2009 por Ehrenfest et al. Nesse estudo, cultivaram-se fibroblastos gengivais da arcada alveolar, prequeratinócitos da derme da região da orelha, preadipócitos da face interna do joelho e osteoblastos da mandíbula. Para cada tipo celular foram feitas quatro culturas em membranas de L-PRF (oriundas do mesmo dador das células a aplicar), outras quatro placas de cultura serviram de controlo para o ensaio e para os osteoblastos e fibroblastos foram cultivadas placas adicionais, na tentativa de pesquisar um efeito cumulativo da presença de duas membranas de L-PRF em cada placa, em vez de uma só. Foi então feito um estudo comparativo da proliferação celular das diferentes linhas, com contagens celulares aos 3, 7, 14 e 21 dias de cultura (com uma contagem adicional para os osteoblastos ao 28º dia), simultaneamente com testes de citotoxicidade. Paralelamente, foi estudada a diferenciação de osteoblastos em meios de diferenciação com L-PRF, sem L-PRF e com L-PRF aplicado no primeiro dia e retirado de seguida com introdução de um meio de diferenciação no segundo dia. A diferenciação de osteoblastos foi mensurada com recurso a doseamentos de DNA e de proteínas celulares, fosfatase alcalina e aplicando a coloração de Von Kossa às culturas obtidas (Ehrenfest et al., 2009a).

Os resultados revelaram uma estimulação crescente da proliferação celular das 4 culturas primárias de células, especialmente acentuada para os osteoblastos, cuja proliferação foi 5,5 vezes superior à registada no grupo controlo, ao fim de 7 dias. Demonstrou-se ainda um efeito dependente da dose nas culturas de osteoblastos com 2 membranas de L-PRF, efeito esse menos exuberante nas culturas de fibroblastos. A razão para tal constatação poderá residir no facto de os fibroblastos, por si só, já terem uma elevada tendência proliferativa que dificilmente é aumentada. A justificação para estes resultados assentará na presença de factores de crescimento e de citoquinas libertadas de maneira gradual e fisiológica, não deixando de existir em grandes quantidades, aliadas a uma matriz de fibrina de características ideais para a indução e condução de migração e multiplicação celular. O efeito mitogénico do L-PRF poderá dever-se também ao componente leucocitário. Este estudo é especialmente importante pela preocupação que houve em obter culturas celulares do mesmo dador que as membranas de L-PRF produzidas. O L-PRF tem uma componente leucocitária significativa que exacerbaria qualquer incompatibilidade imunitária. De facto, os ensaios de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT) para mensuração da citotoxicidade revelaram a ausência de toxicidade, mesmo nas placas de osteoblastos em que duas membranas de L-PRF foram utilizadas (Ehrenfest et al., 2009a).

Uma das questões transversais à produção de concentrados de plaquetas, gerada pela disparidade de resultados entre diferentes protocolos, é a de qual será o número de plaquetas ideal para um biomaterial desta natureza. Assumindo que o coágulo de L-PRF representa cerca de 40% do volume total do tubo, estimou-se no trabalho de Ehrenfest et al. (2009a) que a concentração de plaquetas no coágulo seria 2,5 vezes superior à concentração no sangue do dador, podendo esse valor estar muito próximo do valor ideal.

Observou-se também que a evolução das culturas de prequeratinócitos e preadipócitos era semelhante quando postas em contacto com L-PRF. A estimulação destas culturas foi evidente nos primeiros dias mas diminuiu progressivamente com o passar do tempo. Considerou-se então que certas linhas celulares (mais sensíveis aos efeitos da fibrina, como são os osteoblastos) seriam mais afectadas pela estrutura da rede de fibrina e pelo conteúdo celular do L-PRF do que outras (Ehrenfest et al., 2009a).

Quanto à avaliação sobre a diferenciação dos osteoblastos, os resultados foram surpreendentes na medida em que os doseamentos de fosfatase alcalina (juntamente com a observação das placas coradas pelo método de Von Kossa para constatação da mineralização) e os rácios de DNA/proteína celular sugeriram a presença de diferenciação em simultâneo com proliferação. Os autores consideraram que tal se deveria ao aparecimento de duas subpopulações de células no meio de cultura suplementado com L-PRF. Enquanto a maioria das células estaria sob o efeito dos factores de crescimento plaquetários que por sua vez conduziram à sua proliferação (justificando os rácios de DNA/proteína celular), uma minoria dos osteoblastos iria sofrer diferenciação, possivelmente pelo contacto com a matriz de fibrina ou por influência dos leucócitos, explicando assim os valores de fosfatase alcalina obtidos e a constatação de mineralização por microscopia óptica. Simultaneamente, observou-se que os osteoblastos apareciam à periferia das membranas de L-PRF, estreitamente ligados a cordões de leucócitos que se distribuíam uniformemente em torno da membrana de L-PRF, leucócitos esses que ao fim de 14 dias de cultura ainda permaneciam vivos e em constante relação com as zonas de maior actividade de deposição de matriz óssea. Amplificações maiores sugeriam mesmo que seriam os leucócitos a guiar a progressão da ossificação. Mais uma vez se comprovou a complexidade e heterogeneidade dos coágulos de L-PRF, o que torna este material uma alternativa interessante como preenchimento de soluções de continuidade, nomeadamente, de defeitos ósseos (Ehrenfest et al., 2009a).

Face à marcada estimulação da proliferação de osteoblastos encontrada nos trabalhos de Ehrenfest et al. (2009a) e de He et al. (2009), cientistas da universidade de Taiwan debruçaram-se sobre qual seria a via pela qual o L-PRF modelaria os marcadores proliferativos, osteolíticos e osteogénicos dos osteoblastos. Para tal, utilizou-se uma linha de osteoblastos U2OS, cultivados em placas com membranas de L-PRF trituras em quadrados de 1x1cm (grupo de teste), comparando com osteoblastos em culturas sem L-

PRF. Com recurso a técnicas de *Western blot*, mediu-se o grau de fosforilação da proteína quinase regulada por sinais extracelulares (ERK) e a produção de osteoprotegerina (OPG). A ERK é representante de uma das cascatas de quinases proteicas activadas por mitogénios e que desempenha um papel importante no crescimento e diferenciação celular. A osteoprotegerina é um inibidor natural da actividade dos osteoclastos, que se liga ao ligando do receptor activador do factor- κ B nuclear (RANKL), bloqueando a sua interacção com o receptor RANK. Esse mesmo estudo revelou que o L-PRF aumentava a fosforilação de ERK nas células U2OS, podendo ser esta a via responsável pela estimulação da proliferação celular. A expressão de OPG encontrou-se também aumentada, enquanto a expressão de RANKL (também avaliada) não havia sido significativamente alterada, ou por aumento do número de osteoblastos secretores de OPG e/ou pelo aumento da secreção de OPG por cada osteoblasto. Demonstrou-se assim que a proliferação de osteoblastos poderá ocorrer tanto pela via da regulação positiva da expressão da proteína ERK como pela supressão da osteoclastogénese por aumento da secreção de OPG. Dessa forma, foi uma vez mais sustentada a premissa da utilidade deste biomaterial na regeneração óssea (I-Chang Chang, Tsai & Yu-Chao Chang, 2010).

A hipótese da libertação faseada de citocinas e factores de crescimento a partir da rede de fibrina ainda não havia sido fundamentada cientificamente, sendo que esse era um dos argumentos abonatórios da técnica de Choukroun quando comparada com os protocolos predecessores de PRP. Estudos prévios já haviam sugerido que uma libertação prolongada de factores de crescimento era benéfica para a reparação óssea (Tsay et al., 2005). Nesse sentido, Ehrenfest, de Peppo, Doglioli e Sammartino publicaram em 2008 um trabalho que avaliava a libertação de factores de crescimento (TGF β -1, PDGF-AB e VEGF) e de uma glicoproteína importante para a coagulação, a trombospondina-1 (TSP-1) durante 7 dias, comparando a quantidade final libertada ao fim de 7 dias com a quantidade obtida por extracção forçada a partir das membranas de L-PRF. Nesse estudo, foram produzidos 6 coágulos de L-PRF a partir de cada dador. Três desses coágulos foram utilizados para doseamento das moléculas em estudo ao longo dos 7 dias, sendo os restantes três submetidos a extracção forçada e imediata de exsudado para doseamento das mesmas moléculas. O objectivo final era o de traçar a cinética de libertação de factores de crescimento e citocinas a partir dos coágulos de L-PRF. Os resultados mostraram que após um aumento rápido das quantidades de TGF β -1, PDGF-AB e TSP-1 nas primeiras 24 horas do ensaio, estas continuavam a aumentar durante os 5 dias seguintes (embora a um ritmo mais lento), estabilizando em níveis elevados nos últimos 2 dias do ensaio. Ligeiramente diferente era o padrão de secreção de VEGF, cujo aumento inicial se fazia em 4 horas, mantendo depois um perfil de secreção semelhante ao das outras moléculas em estudo. Ficou também provado que as quantidades de TGF β -1, PDGF-AB, VEGF e TSP-1 obtidas por extracção forçada do exsudado contido nos coágulos era sempre

significativamente inferior à quantidade total obtida durante os 7 dias. Assim se conclui que os coágulos de L-PRF conseguem um efeito prolongado no ponto onde são aplicados, estimulando o ambiente celular durante pelo menos uma semana (Ehrenfest et al., 2009b).

O doseamento de TSP-1 mereceu especial atenção. A TSP-1 é uma glicoproteína responsável pelas interações entre a matriz de fibrina e as células, criando ligações com o factor de Von Willebrand, protegendo o coágulo de proteases fibrinolíticas e protegendo dessa forma as ligações interplaquetárias. Este efeito protector e reforçador da TSP-1 sobre os coágulos confere ao L-PRF um efeito cicatricial e hemostático assinalável, particularmente útil em pacientes sob efeito de terapêutica anticoagulante. Por fim, pelos perfis de secreção e pelas quantidades finais obtidas, este estudo sugere que os leucócitos produzem grandes quantidades de TGF β -1 e VEGF, sublinhando mais uma vez a pluralidade das suas funções e a importância da componente leucocitária neste concentrado (Ehrenfest et al., 2009b).

Um ano mais tarde, He, Lin, Hu, Zhang & Wu (2009), compararam o padrão de secreção de PDGF-AB e TGF β -1 entre o PRP obtido com o protocolo de Curasan[®] e o L-PRF de Choukroun. Para ambas as moléculas, os valores obtidos para o PRP eram significativamente superiores no primeiro dia quando comparados com os do L-PRF. A partir do primeiro dia, os valores obtidos para o L-PRF foram sistemática e significativamente mais elevados que os obtidos a partir do PRP. Contrastando com o L-PRF, o PDGF-AB e o TGF β -1 mostraram uma libertação exuberante e rápida, diminuindo rapidamente a partir do primeiro dia. Uma vez mais se validou a cinética de libertação de factores de crescimento e citocinas do L-PRF, favorável à sua utilização prática.

Com vista a otimizar o uso clínico dos coágulos de L-PRF, Su et al. (2009) propuseram-se a dosear PDGF-AB, TGF- β 1, VEGF, EGF e IGF-1 no exsudado de coágulos de L-PRF, exsudado esse obtido por centrifugação dos coágulos de L-PRF, recolhido aos 5, 60, 120 e 300 minutos pós produção do coágulo. Os resultados obtidos foram comparados com doseamentos dos factores de crescimento supracitados feitos em soro sobrenadante (PPP) obtido pela produção de L-PRF, soro esse dividido em dois subgrupos: com e sem adição de trombina bovina.

A adição de trombina ao PPP não conduziu nem a um aumento do conteúdo de factores de crescimento nem à formação de um coágulo de fibrina, o que confirma que aquando da formação de um coágulo de L-PRF, este engloba a totalidade da fibrina presente no tubo, assim como a esmagadora maioria das plaquetas (Ehrenfest et al., 2010a). Quando doseados os factores de crescimento no exsudado obtido a partir o coágulo de L-PRF, as concentrações de PDGF-AB, TGF- β 1, VEGF e EGF revelaram-se crescentes ao longo de todo o ensaio e significativamente superiores às concentrações alcançadas no PPP. Estando as plaquetas ausentes do PPP, os doseamentos dos mesmos factores resultaram em valores constantes e significativamente inferiores aos obtidos no exsudado de L-PRF. O

IGF-1 representou a excepção e ao ser uma proteína essencialmente plasmática, as suas concentrações mantiveram-se constantes ao longo de todo o ensaio. Estes resultados vêm suportar os obtidos no estudo já referido de Ehrenfest et al. (2008) que já haviam determinado o perfil de secreção dos factores TGF β -1, PDGF-AB e VEGF. Assim se comprovou que a utilização dos coágulos de L-PRF deverá ser tão precoce quanto possível após a sua produção, para rentabilizar a produção de factores de crescimento que resulta da activação plaquetária inerente à centrifugação. Adicionalmente, o exsudado que se produza por repouso dos coágulos de L-PRF em superfície não absorvível deverá ser aproveitado e aspergido assepticamente pela área cirúrgica, evitando assim a rejeição de quantidades relevantes de factores de crescimento (Su et al., 2009).

Em 2010 é publicado outro estudo importante que veio fortalecer a afirmação feita um ano antes, quando Ehrenfest e outros constatavam que o L-PRF causava tanto proliferação como diferenciação celular em culturas de osteoblastos. Ehrenfest, Doglioli, de Peppo, Del Corso e Charrier (2010) colheram células estaminais mesenquimatosas ósseas (BMSC), aproveitando o tempo cirúrgico da colocação de implantes na arcada maxilar, que posteriormente cultivaram em condições de proliferação ou diferenciação, com ou sem L-PRF obtido a partir dos mesmos dadores de BMSC. Ao fim de 7 dias, as membranas de L-PRF foram retiradas, sendo que paralelamente foram feitas culturas com 2 membranas de L-PRF (para constatar a presença de efeito dependente da dose aplicada). Realizaram-se contagens celulares, testes de citotoxicidade, doseamentos de fosfatase alcalina, análises histológicas após aplicação da coloração de Von Kossa e contagens dos nódulos de mineralização aos 3, 7, 14, 21 e 28 dias.

Os resultados obtidos demonstraram que o L-PRF havia estimulado significativamente a proliferação e diferenciação das culturas de BMSC ao longo de toda a experiência. Este efeito positivo era dependente da dose de L-PRF aplicada durante as primeiras semanas nas culturas em condições normais e ao longo de todo o ensaio nas culturas em condições de diferenciação. As culturas sem L-PRF e em condições de diferenciação atingiram o mesmo grau de diferenciação que as culturas de L-PRF em condições normais, sendo esse efeito também positivamente afectado pelo número de membranas de L-PRF aplicadas. A análise por microscopia electrónica que se conduziu ao décimo quarto dia do ensaio, mostrou também que os nódulos de mineralização nas placas de cultura eram mais numerosos nas culturas com L-PRF quando comparadas com os grupos controlo. Nesse mesmo estudo, o L-PRF aparentemente estimulou de forma simultânea, de maneira dependente da dose aplicada, a proliferação (registada pelas contagens celulares sucessivas) e a diferenciação celular, caracterizada pelos resultados elevados dos doseamentos de fosfatase alcalina e pela observação dos nódulos de mineralização das placas. Os resultados das provas de MTT mostraram novamente a ausência de citotoxicidade, coincidente com o que outros trabalhos, referidos nesta dissertação, já

havia encontrado (Ehrenfest et al., 2009). Uma vez mais se confirmou o enorme potencial do L-PRF como biomaterial de enxerto para cicatrização óssea, com propriedades osteocondutoras e osteoindutoras (Ehrenfest et al., 2010b).

Após o reconhecimento das propriedades de condução e indução da migração e proliferação celular por parte das redes de fibrina, impunha-se a comparação entre membranas de L-PRF e as membranas de colagénio comumente utilizadas, sob o conceito de Regeneração Óssea Guiada (em que se usa uma matriz proteica para fomentar o desenvolvimento de células ósseas, com vista a utilizá-las posteriormente na cicatrização óssea). Esta concepção pressupõe a aceitação de 4 pré-requisitos para a escolha de materiais de enxerto: a inibição de migração celular indesejada; a criação e manutenção de um espaço que se pretenda que venha a ser preenchido por tecido ósseo; a protecção do coágulo que se gera nesse mesmo espaço e a estabilidade dos materiais de preenchimento na solução de continuidade que se pretende abordar (F. Inchingolo et al., 2010).

Gassling et al. (2010) decidiram então comparar o crescimento de células periósticas humanas em membranas de L-PRF com o seu crescimento em membranas de colagénio comercialmente disponíveis (Bio-Guide[®]). Para tal, cultivaram uma quantidade conhecida de células periósticas em L-PRF e membranas de Bio-Guide[®]. Seguidamente, avaliaram a viabilidade celular pelas colorações de diacetato de fluoresceína (FDA) e Iodeto de Propídio (PI), dosearam a enzima Lactato Desidrogenase (LDH) para avaliar a biocompatibilidade e usaram o teste de MTT, o reagente WST-I e o teste de ELISA de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) para quantificação da proliferação celular. Os resultados mostraram que ambas as membranas exibiam uma grande quantidade de células com declarada vitalidade (pela coloração de FDA) e ausência de evidência de morte celular (que seria evidenciada pela coloração de PI). Os resultados dos testes de BrdU indicaram maior proliferação celular nas membranas de L-PRF do que nas de colagénio, enquanto os testes de MTT e WST sugeriram maior actividade metabólica também para as membranas de L-PRF. No entanto, os doseamentos de LDH expuseram maior citotoxicidade nas membranas de L-PRF, quando comparadas com os grupos controlo (Gassling et al. 2010).

É necessário destacar, uma vez mais, que o L-PRF é um concentrado não só de plaquetas mas também de leucócitos e como tal, todas as incompatibilidades imunitárias estão presentes, podendo mesmo estar exacerbadas. No trabalho de Gassling et al. (2010), utilizaram-se células periósticas e coágulos de L-PRF de dadores diferentes o que poderá potencialmente ter gerado uma reacção imunitária da componente leucocitária contra as células periósticas introduzidas. Mesmo considerando que os resultados de proliferação e de actividade metabólica para as células cultivadas em L-PRF tenham sido significativamente melhores (mais uma vez corroborando as qualidades desta matriz de fibrina como estimulador do desenvolvimento celular), a componente leucocitária deste material poderá inviabilizar a utilização conjunta destes coágulos com células oriundas de

um dador diferente. Todavia, os autores consideram que a utilização de membranas de L-PRF sob o conceito de Regeneração Óssea Guiada é uma alternativa viável, pelos resultados de proliferação celular e pelo baixo custo associado (Gassling et al., 2010).

Outros autores sugerem que os resultados de citotoxicidade obtidos pela LDH poderão também ser explicados pela degradação do resíduo de glóbulos vermelhos que é englobado pelas membranas de L-PRF, não sendo necessariamente fruto de uma reacção imunitária organizada pela componente leucocitária contra elementos celulares e moleculares que sejam reconhecidos como *non-self* (Gassling et al., 2013). Embora se realce a importância da inclusão dos primeiros 2 a 3 milímetros de glóbulos vermelhos (pela presença de plaquetas e leucócitos nessa camada), sublinha-se que uma quantidade excessiva de glóbulos vermelhos poderá conduzir a uma reacção inflamatória local, prejudicando o ambiente celular e bioquímico de cicatrização que se pretende induzir.

Em 2011, Y-C Chang e J-H Zhao estudaram os efeitos do L-PRF em fibroblastos do ligamento periodontal (PDLF's), colhidos de pacientes envolvidos em extracções dentárias. Uma vez mais foi encontrado um aumento da fosforilação da ERK, assim como um aumento da expressão de OPG, significativamente relevantes nos 5 dias em que a culturas de células foram monitorizadas. Resultados semelhantes já haviam sido obtidos por Chang et al. (2010) num estudo já referido por esta revisão bibliográfica. Simultaneamente foram também feitos doseamentos de fosfatase alcalina, cujos valores se encontravam significativamente elevados ao longo dos 5 dias do ensaio. A fosfatase alcalina é uma glicoproteína membranária que se considera um dos indicadores da presença de osteoblastos e da formação de novo osso. Consequentemente, expressão aumentada de fosfatase alcalina indicou que o L-PRF poderá contribuir para a diferenciação dos PDLF's em osteoblastos, um resultado interessante e que sustenta ainda mais a sua aplicação para obtenção de ganhos ósseos mandibular e maxilar, previamente à colocação de implantes dentários (uma das suas mais comuns aplicações).

Os resultados *in vitro* e *in vivo* da utilização de L-PRF na regeneração e formação de tecido ósseo, assim como a proliferação de osteoblastos que comprovadamente gera, despertaram também uma curiosidade aprofundada sobre quais seriam os processos de adesão e proliferação envolvidos neste processo. Wu et al. publicaram em 2012 um estudo com o propósito de identificar os efeitos do L-PRF na adesão e proliferação celular de osteoblastos da linha U2OS através do teste colorimétrico de WST-I e da coloração de azul de alamar, respectivamente. Aplicou-se também um Western Blot para avaliar a expressão de p-Akt, proteína de choque térmico 47 (HSP47) e da lisil oxidase (LOX) nessa linha de osteoblastos. A proteína Akt (p-Akt) é uma proteína que existe a jusante na cascata de reacções dependentes do PI3, que desempenha um papel importante na sobrevivência, proliferação e síntese proteica celular. A HSP47 é uma molécula “chaperone” da síntese e processamento das moléculas de colagénio, envolvida no processo de ligação e estabilização das

moléculas de procolagénio. A LOX é uma enzima responsável pelos passos iniciais da conversão dos monómeros solúveis de colagénio e elastina em fibras insolúveis da matriz extracelular. Como tal, uma sobreexpressão da LOX e da HSP47 justificariam um aumento da deposição de matriz extracelular que em última análise derivaria em aumento da deposição de tecido ósseo.

Os resultados do estudo previamente descrito (Wu et al. 2012) revelaram um aumento significativo da aderência celular dos osteoblastos implantados em culturas com L-PRF. A proliferação celular revelou-se significativamente aumentada nos 5 dias do ensaio para as mesmas culturas, em comparação com os grupos controlo. A fosforilação da Akt revelou-se também significativamente aumentada pela adição de L-PRF, assim como a expressão de HSP47 e da LOX. O L-PRF demonstrou assim uma correlação positiva com a aderência celular (que é especialmente importante para a organização dos tecidos em regeneração, acelerando a fase de cicatrização inicial), proliferação celular (que é um pré-requisito para a formação de tecido novo e preenchimento das soluções de continuidade, indispensável durante a cicatrização) e com a fosforilação da Akt (sugerindo assim uma possível via justificativa para a proliferação aumentada que se atinge com a utilização de L-PRF, por acção factores como o PDGF).

O mesmo ensaio demonstrou também que o L-PRF conduz a um aumento da deposição de matriz extracelular (que tem uma função estrutural e funcional na formação de tecido ósseo) através da expressão aumentada da HSP47 e da LOX. Essa descoberta providencia, não só mais uma razão explicativa para os resultados clínicos e laboratoriais que justificam os aumentos de formação de tecido ósseo, encontrados após a adição de L-PRF, como também elucidam sobre a via enzimática e molecular que conduz a esse resultado final (Wu et al., 2012).

À semelhança do primeiro estudo que compara a utilização de membranas de colagénio com membranas de L-PRF para implantação de células periósticas, Gassling et al. (2013) volta a comparar a utilização de ambos os biomateriais mas para cultivo de osteoblastos. Nesse estudo pretendeu-se comparar a compatibilidade celular com ambas as membranas, estudar a proliferação celular dos osteoblastos em culturas com soluções obtidas a partir de coágulos de L-PRF e de membranas de colagénio, assim como avaliar a proliferação de osteoblastos cultivados directamente em membranas de L-PRF e colagénio e a sua diferenciação a partir de doseamentos de fosfatase alcalina. Os resultados mostraram maior crescimento e proliferação celular nas membranas ou derivados de L-PRF, em simultâneo com doseamentos significativamente mais elevados de fosfatase alcalina para os osteoblastos cultivados em membranas e coágulos de L-PRF. No entanto, os resultados dos testes de LDH revelaram maior citotoxicidade para as culturas com L-PRF, sendo que as razões que estão na base dessa observação já foram desenvolvidas previamente nesta dissertação.

Os autores atribuem as diferenças de proliferação e aderência celular à presença de proteínas como a fibronectina nos coágulos de L-PRF. Estudos provaram que, de todas as proteínas da matriz extracelular, os osteoblastos aderem principalmente à fibronectina, que influencia a sua morfogênese, diferenciação e até sobrevivência. Sendo que metade da fibronectina tem origem plasmática, a sua presença em derivados do sangue como o L-PRF é incontestável. Contrariamente ao que acontece com formulações comerciais de colagénio, o protocolo de preparação de L-PRF não envolve nenhuma manipulação físico-química para além da centrifugação o que leva a que não se associem as mesmas perdas de proteínas (que os processos de purificação acarretam) específicas para a estruturação de tecido ósseo (Gassling et al. 2013). A título de exemplo é citado o TGF- β , que não só estimula a síntese de colagénio e fibronectina a partir de vários tipos celulares, como também estimula a expressão de uma série de integrinas que medeiam a aderência celular a proteínas estruturais como a vitronectina, fibronectina e o colagénio.

Resultados análogos foram também obtidos em estudos comparativos que se debruçaram sobre os efeitos do L-PRF na migração, mineralização, proliferação e expressão genética em células de folículo dentário, de ligamento periodontal e de osso alveolar. Em todos os ensaios houve um benefício na utilização de L-PRF, explorando também os benefícios obtidos na cicatrização de tecidos moles (Li et al., 2013).

Todos estes trabalhos sustentaram inúmeras aplicações clínicas de manipulados de L-PRF, aplicações essas que de seguida serão sucintamente abordadas.

3.2.

3.3. L-PRF: estudos *in vivo*

Uma das aplicações mais comumente descritas para manipulados de L-PRF é a de preenchimento do espaço criado por osteotomias para elevação do pavimento do seio maxilar em pacientes humanos. A perda progressiva de dentes que ocorre em humanos leva a atrofia do osso alveolar, conduzindo a que não exista densidade e espessura óssea necessária para futura colocação de implantes. Nesse sentido, um dos procedimentos habituais é o de aumento dessa mesma espessura e densidade óssea por levantamento do pavimento do seio maxilar (evitando a perfuração da sua membrana basal) e preenchimento do espaço criado por um material de enxerto ósseo (Diss et al., 2008). Este procedimento pode ser acompanhado por colocação simultânea de implantes, podendo também a colocação dos implantes ser diferida para outro momento cirúrgico.

Um dos primeiros trabalhos referindo a utilização de L-PRF como material de enxerto na elevação do seio maxilar foi publicado por Diss et al. (2008). Nesse estudo prospectivo, foi avaliada radiograficamente a espessura de osso alveolar, juntamente com o ganho ósseo por elevação do pavimento do seio maxilar. Os resultados mostraram que ao fim de 2 a 3

meses da aplicação de L-PRF o ganho ósseo já permitia a aplicação de implantes, o que antecede o prazo de 6 meses para a colocação de implantes sem uso de material de enxerto citado noutras publicações. Os autores destacam que a aplicação exclusiva de L-PRF permite, entre outros benefícios, o de evitar os enxertos de osso esponjoso ou corticoesponjoso, com toda a morbilidade associada (no caso de osso autólogo). Simultaneamente, contorna-se o uso de xenoimplantes e análogos sintéticos com uma alternativa economicamente mais viável e com resultados práticos equivalentes ou superiores.

Posteriormente, foi sugerida a utilização conjunta de L-PRF, Metronidazol a 0,5% e osso bovino liofilizado para a reabilitação de osso maxilar (Simonpieri, Del Corso, Sammartino & Ehrenfest, 2009). Os trabalhos de Choukroun et al. (2006) já haviam demonstrado que o L-PRF, quando misturado com outro tipo de xenoimplante, actua como “cimento” biológico entre os vários elementos do enxerto, favorecendo a angiogénese, a retenção de células estaminais e a migração de osteoblastos para o centro do enxerto, melhorando a integração do osso exólogo. No caso concreto desta paciente (Simonpieri et al., 2009), foram desbridados os tecidos moles que envolviam a maxila na sua porção rostral, com desbridamento e estimulação da face vestibular do bordo da crista alveolar anterior. Os seios maxilares foram preenchidos pela mistura supracitada, também usada para aumentar a espessura do osso alveolar. Para acelerar a velocidade de cicatrização da incisão e proteger o material de enxerto aplicado, foram utilizadas membranas de L-PRF para revestir a área enxertada, tendo sido essas membranas fixadas com fio de sutura. Após 75 dias da realização da cirurgia, foi realizada uma tomografia axial computadorizada (TAC) que revelou homogeneidade radiográfica entre o osso alveolar e o osso que preenchia a área enxertada.

O L-PRF demonstrou novamente neste estudo ser uma alternativa viável como osteoindutor e osteocondutor. Neste caso em particular, as membranas de L-PRF pelas suas propriedades adesivas mostraram não só que podem ter um papel de protecção mecânica de zonas recém-intervencionadas (com grande exposição óssea), como também compõem um cimento biológico para agregação e incorporação de materiais de enxerto ósseo, conferindo uma força estrutural acrescida ao enxerto. O L-PRF aparenta ainda ter, através da sua componente leucocitária, um papel regulador da inflamação local gerada pela manipulação cirúrgica dos tecidos, diminuindo a dor pós-operatória e o aparecimento de edemas (Simonpieri et al., 2009).

Numa segunda parte (Simonpieri et al., 2009), os referidos autores debruçaram-se sobre a colocação de 184 implantes em 20 pacientes aos quais aplicaram este protocolo de enxerto. O sucesso do procedimento foi mensurado avaliando-se a mobilidade dos implantes aplicados, a radiopacidade do osso adjacente aos implantes e pela pesquisa de sinais neuropáticos, de dor ou inflamação. Neste grupo de doentes, os investigadores

consideraram todas as reabilitações bem-sucedidas, independentemente do tipo ou número de implantes usados. O crescimento e maturação dos tecidos gengivais foi exuberante e positivo, a estabilidade e resistência óssea ao fim de 3 meses era já a pretendida e o hemorragia óssea durante a cirurgia comprovou a presença de irrigação abundante, tendo sido o período médio de seguimento de 2 anos e 36 dias.

O uso exclusivo de L-PRF como material de enxerto merece também especial atenção, até pelas vantagens teóricas supramencionadas da não utilização de osso autólogo, heterólogo, xenoimplantes ou de matrizes sintéticas como materiais de enxerto. Mazor et al. (2009) procuraram perceber a viabilidade da utilização exclusiva de L-PRF em elevações do pavimento do seio maxilar, com colocação simultânea de implantes. Para tal, foi levado a cabo um estudo radiológico e histológico em que 25 elevações do seio maxilar foram efectuadas, com realização de radiografias (simples e volumétricas computadorizadas) aos 6 meses de pós-operatório. No mesmo instante, foram realizadas biópsias ósseas em 9 pacientes. Os resultados revelaram ganhos de osso residual significativos (em média 10,1 mm) com preservação da integridade da membrana sinusal (ou de Schneider) e sem perda de nenhum dos 41 implantes aplicados. Os ganhos relevantes de osso sub-sinusal ao fim de 6 meses abrem um precedente aliciente. Em média, 33% da área das biópsias conseguidas era constituída por tecido ósseo neoformado, numa localização onde apenas se haviam depositado coágulos e membranas de L-PRF. Consequentemente, o tecido ósseo gerado só poderia ser consequência da capacidade osteocondutora e osteoindutora deste biomaterial. A análise histológica revelou a presença de osso trabecular normal, osteoblastos e osteócitos. Contudo, algumas regiões apresentavam uma matriz extracelular de tipo ósseo mas ainda não mineralizada. Esta observação é relevante na medida em que a utilização de xenoimplantes em procedimentos análogos revela má integração dos fragmentos ósseos que, apesar da rigidez aparente, são clinicamente frágeis (uma das características desvantajosas da sua utilização).

Outra das vantagens é a utilização possível das membranas de L-PRF sob o conceito de Regeneração Óssea Guiada. Uma das causas de insucesso destes procedimentos é a invasão da osteotomia criada pelo tecido mucogengival (altamente proliferativo), impedindo que se atinja a arquitectura óssea desejada e uma regeneração máxima. No entanto, a aplicação de membranas de L-PRF para encerrar o espaço da osteotomia impediu a invasão desse espaço pelos tecidos envolventes, permitindo um restabelecimento óptimo do tecido ósseo (Mazor et al., 2009). Estes resultados alertam para o potencial dos manipulados de L-PRF para revestimento de defeitos ósseos, pelas vantagens clínicas observadas.

Este estudo (Mazor et al., 2009) é validado por outro estudo (Simonpieri et al., 2011) que relata também a utilização exclusiva de L-PRF como material de enxerto em elevações do seio maxilar através de osteotomia lateral, em 20 pacientes no decorrer de 6 anos. Seis

meses após a realização da cirurgia, todos os implantes demonstraram ser estáveis, sendo o período de seguimento máximo de 6 anos e o mínimo de dois, período esse no qual não se registou perda de nenhum implante e o ganho médio de espessura óssea foi de 10,4 mm, semelhante ao atingido por Mazor et al. (2009) e especialmente relevante se se considerar que a espessura média de osso residual inicialmente era de 1,8 mm (Simonpieri et al., 2011). Particularmente interessante é a noção de que a não utilização de nenhum método de enxerto acarreta, por vezes, o envolvimento do implante por tecido conjuntivo denso cuja funcionalidade é obviamente inferior ao do tecido ósseo. No entanto, a utilização do coágulo potenciado que se obtém pelo método de Choukroun conduz à formação de tecido ósseo funcional e histologicamente normal, como se observou em alguns dos estudos já referidos nesta dissertação.

Resultados idênticos foram obtidos com a utilização de L-PRF em conjunto com osso bovino desproteínizado (Bio-Oss[®]), em 23 pacientes que fizeram levantamento do seio maxilar com colocação simultânea de implantes. Todos os pacientes demonstraram não ter dor à percussão, estabilidade óptima dos implantes, densidade óssea significativa na região adjacente aos implantes e integridade dos tecidos moles adjacentes aos implantes. A análise radiográfica feita demonstrou que passados seis meses da cirurgia, havia uma quantidade de osso neoformado significativa, que integrava intimamente o osso residual, sendo o aumento médio da densidade de tecido ósseo peri-implante de 31% (Inchingolo et al., 2010). Estes resultados, embora positivos, não aparentam ser superiores aos apresentados aquando da utilização exclusiva de L-PRF para uma técnica análoga de levantamento do seio maxilar (Mazor et al., 2009). Contudo, comprova-se que a combinação de osso bovino desproteínizado e L-PRF constitui um método de enxerto viável e com resultados finais atractivos (Inchingolo et al., 2010).

Esta formulação de osso bovino desproteínizado, o Bio-Oss[®], voltou a ser utilizada num estudo clínico (radiográfico), histomórfico e histológico, que compara a utilização simultânea de L-PRF com Bio-Oss[®] com a utilização de Bio-Oss[®] isolada no preenchimento de elevações do seio maxilar. Aos 6 meses de pós-operatório, foram colhidas biópsias da zona de maxila enxertada. A percentagem de osso trabecular neoformado no grupo que incluiu L-PRF foi 1,4 vezes superior à do grupo controlo, que por seu lado demonstrou uma percentagem de xenoimplante residual 1,5 vezes maior que o grupo de teste (evidenciando assim menor remodelação óssea e menor integração do xenoimplante). Foi também observado um maior contacto entre os fragmentos de xenoimplante e o osso neoformado no grupo de teste. Todavia, as diferenças encontradas não foram estatisticamente relevantes, provavelmente devido à reduzida dimensão da amostra em estudo (n = 11). No entanto, este trabalho não deixa de constituir mais uma indicação para a viabilidade da utilização conjunta de L-PRF e Bio-Oss[®] (Zhang et al., 2012).

No seguimento desta linha de trabalhos que investigaram a utilização deste modelo de enxerto (L-PRF e Bio-Oss[®]), Tatullo et al., (2012) realizaram um estudo em que compararam esse modelo de enxerto com a utilização exclusiva de Bio-Oss[®], para levantamento do seio maxilar com inserção posterior de implantes em 60 pacientes que foram depois seguidos clínica e radiograficamente. Foram realizados 72 levantamentos do seio maxilar, seguidos de colocação de implantes (240 no total) noutra ocasião cirúrgica, com uma taxa de sucesso de 100%. Os 60 doentes foram ainda divididos em 3 grupos iguais: no primeiro grupo, houve uma segunda intervenção cirúrgica ao fim de 106 dias de pós-operatório; no segundo essa intervenção teve lugar aos 120 dias e no terceiro grupo ocorreu aos 150 dias. A segunda intervenção foi realizada com a finalidade de se colherem biópsias das zonas intervencionadas, para assim acompanhar histologicamente a formação de tecido ósseo nas zonas enxertadas e para colocação dos implantes. Os autores encontraram nas biópsias colhidas ao fim de 106 dias, no grupo que incluiu a adição de L-PRF, uma quantidade surpreendente de osso trabecular com sinais de vitalidade (tanto por integração dos fragmentos de Bio-Oss[®] como por síntese de tecido ósseo *de novo*), acompanhado por um estroma pouco fibroso e altamente vascularizado. Pela estabilidade dos implantes conseguida e pela imagem histológica obtida, os autores concluíram que ao fim de 106 dias de pós-operatório do levantamento do seio maxilar com utilização de L-PRF no enxerto, já era possível e viável a colocação de implantes, não sendo porém a funcionalidade completa. Assim, confirmou-se um tempo de cicatrização inferior aos 120-150 dias referidos pela bibliografia para o mesmo procedimento, comprovando uma vez mais o poder osteocondutor e osteoindutor do L-PRF e os benefícios da sua utilização (Tatullo et al., 2012).

O efeito hemostático proclamado por Ehrenfest et al. (2008), conseguido por elementos moleculares que se descobriram aumentados, como a TSP-1, veio a ser mais tarde confirmado, numa publicação que descreve a utilização de L-PRF na prevenção de complicações hemorrágicas em extracções dentárias, levadas a cabo em pacientes sujeitos a terapêutica anticoagulante por cirurgia intracardíaca prévia (Sammartino, Ehrenfest, Carile, Tia & Bucci, 2011). Este estudo relata a utilização de coágulos de L-PRF em 168 alvéolos pós extracção, sem alteração da terapêutica anticoagulante em curso. Apenas dois pacientes apresentaram hemorragia (4%) solucionada ao fim de poucas horas com aplicação materiais hemostáticos e de compressão. Dez pacientes (20%) exibiram hemorragia ligeiras cuja resolução foi espontânea ou para a qual bastou a aplicação de compressão nas duas horas pós cirurgia. Os restantes 38 pacientes (76%) mostraram uma hemostase adequada após as extracções dentárias a que foram sujeitos. A cicatrização que se seguiu à utilização de L-PRF para preencher os alvéolos pós extracção foi rápida, sem registo de dor assinalável e sem surgimento de infecção, tendo sido possível a remoção de suturas uma semana após a cirurgia. Os investigadores atribuíram a percentagem de hemorragias observada a um período de seguimento dos pacientes mais longo e minucioso

que o praticado em estudos análogos e a um incorrecto posicionamento do coágulo de L-PRF em pacientes cujo osso alveolar residual era mínimo e não sustentava a colocação desses mesmos coágulos. O L-PRF demonstrou novamente vantagens neste tipo de aplicação hemostática, pela pluralidade dos seus efeitos. Ao contrário de outros materiais meramente utilizados pelo seu efeito hemostático, como as malhas de celulose oxidada e o ácido tranexâmico, o L-PRF actua também pelo seu poder cicatricial e conteúdo imunitário. Adicionalmente, enquanto os xenoimplantes, os autoenxertos, heteroenxertos e materiais sintéticos de enxerto, quando infectados geram sempre reacção de corpo estranho, o L-PRF actua sempre como um coágulo sanguíneo optimizado, sem registo de desconforto ou dor local. Assim, o L-PRF demonstra ser uma alternativa particularmente viável para enxerto de zonas contaminadas (como os alvéolos de extracção dentária).

Por fim, sublinha-se a produção de coágulos de L-PRF em pacientes sob efeito de anticoagulantes. Essa medicação não pareceu, no entanto, influenciar o protocolo de L-PRF, bastando apenas que se utilizasse um tempo de centrifugação mais prolongado. Conclui-se assim que a produção destes coágulos não se caracteriza apenas como um processo bioquímico mas também como resultando de uma indução mecânica fruto da centrifugação (Sammartino et al., 2011).

Existe também registo de um caso em que L-PRF foi utilizado com sucesso em combinação com fosfato β -Tricálcico, um material de enxerto sintético, osteocondutor, cuja reabsorção liberta iões bioactivos que são posteriormente utilizados na mineralização óssea. Esta abordagem foi utilizada para a resolução cirúrgica de um quisto periapical crónico, com o propósito que estimular a cicatrização óssea da lesão. O paciente foi reavaliado de 3 em 3 meses durante 12 meses, tendo sido a cicatrização bem-sucedida, com ganho ósseo mensurável radiograficamente e sem sintomatologia (Jayalakshmi et al., 2012). Será, todavia, conveniente sublinhar a necessidade de realizar um estudo prospectivo, com grupo controlo e casuística suficiente para validar esta abordagem.

Relativamente ao poder imunológico e anti-infeccioso dos coágulos de L-PRF, a bibliografia é escassa e quase nunca se debruça exclusivamente sobre estas características deste biomaterial. No entanto, Hoaglin e Lines (2013) procuraram saber se existia uma diferença na prevalência de osteíte localizada nos pacientes cujos alvéolos de extracção haviam sido preenchidos por um coágulo de L-PRF, quando comparados com os pacientes em que tal não tinha sido feito. Foram comparados 200 pacientes tratados consecutivamente no mesmo centro, a quem foi feita a extracção bilateral do terceiro molar mandibular (num total de 400 extracções), sendo que nos últimos 100 os autores aplicaram L-PRF. À excepção do material de preenchimento dos alvéolos de extracção, todos os pacientes foram alvo de técnicas cirúrgicas normais e idênticas, com o mesmo protocolo intra-operatório de antibioterapia e corticoterapia intravenosa, seguida de analgesia e corticoterapia pós-operatória de rotina. Hoaglin e Lines (2013) registaram uma redução significativa (90%) e

estatisticamente relevante ($P=0,0001$) da incidência de osteíte localizada nos pacientes tratados com L-PRF. As idas ao médico pós cirurgia foram menos frequentes para os pacientes tratados com L-PRF (124 visitas para 100 pacientes vs. 147 visitas para 100 pacientes sem tratamento com L-PRF). Dentro do grupo de pacientes que desenvolveram osteíte localizada (OL), os doentes que não haviam sido submetidos a colocação de L-PRF (13 pacientes com OL em 19 pontos) careceram em média de mais consultas e mais tempo para atingirem a resolução da sua infecção. Mais estudos seriam necessários para comprovar a eficácia anti-infecciosa da utilização de L-PRF, devendo a padronização da terapêutica farmacológica e dos critérios de diagnóstico da presença ou ausência de infecção ser previamente estabelecidos e avaliados por um operador alheio à utilização ou não de L-PRF. Todavia, a diferença expressiva encontrada entre os dois grupos não deixa de constituir uma indicação a ter em conta sobre o papel anti-infeccioso local do L-PRF.

Embora não seja extraordinariamente extensa, a bibliografia disponível sobre aplicações clínicas e laboratoriais de L-PRF fornece já provas substanciais da sua utilidade como biomaterial para numerosas aplicações cirúrgicas, das quais se sublinham as na área da cirurgia ortopédica. O protocolo de Choukroun, tendo em conta a sua facilidade e simplicidade de execução, aliadas ainda a um baixo custo intrínseco, tem potencialidade para uma aplicabilidade em Medicina Veterinária. Sublinha-se, no entanto, que até à data não existe referência à utilização de L-PRF em ossos longos na bibliografia existente e que mais estudos seriam necessários para atestar a sua possível aplicabilidade em ossos do esqueleto apendicular.

3.4. Utilização de concentrados de plaquetas na ossificação de ossos longos

A literatura não é uníssona quando se refere às vantagens da utilização de concentrados de plaquetas como adjuvantes da ossificação. A interpretação do valor científico dos estudos publicados até hoje sobre a utilização de concentrados de plaquetas (L-PRP e P-PRP apenas) em ossos longos não é fácil (Iqbal, Pepkowitz & Klapper, 2011). Sob a designação de PRP, existem no mercado variadíssimos *kits* de produção de concentrados de plaquetas, cuja repetibilidade e conteúdo do produto final está frequentemente mal definida (Iqbal et al., 2011).

Malhotra, Pelletier, Yu e Walsh (2013) redigiram recentemente um artigo que pretendia rever a literatura actualmente existente sobre a utilização de concentrados de plaquetas na cicatrização óssea. Os resultados iniciais que foram obtidos pela utilização destes biomateriais em alterações ósseas mandibulares pareciam promissores, o que suscitou incontáveis aplicações no campo da ossificação e osteossíntese, por sua vez com resultados contraditórios. Os autores referem então uma sucessão de estudos, cuja

disparidade de resultados limita a evidência científica para a utilização de concentrados de plaquetas na cicatrização óssea (Malhotra et al., 2013).

Hokugo et al. (2005) usaram PRP com efeitos benéficos na cicatrização de osteotomias segmentares no rádio de coelhos, em conjunto com um hidrogel de gelatina. Nesse mesmo estudo, a utilização exclusiva do PRP ou do hidrogel obteve resultados inferiores, estudo esse que conclui também que a matriz de fibrina obtida pelo método de PRP utilizado não era tão osteoindutora quanto o hidrogel de gelatina. Ranly et al. (2007) observaram no seu trabalho que a utilização de PRP juntamente com osso desmineralizado (DBM) humano diminuía o fenómeno de osteoindução após implantação da mistura de DBM com PRP no músculo gastrocnêmio de ratos imunossuprimidos, quando comparada com a utilização de DBM com PPP. Noutro estudo, Ni, Tang, Wang e Li (2011) não encontraram benefícios na utilização de PRP com DBM na osteogénese por distração de osteotomias da tíbia em coelhos. A utilização de osso desmineralizado liofilizado (FDDb), osso mineralizado liofilizado (FDMB), de FDDb e PRP e de FDMB e PRP como materiais de enxerto em osteotomias no crânio de coelhos por Aghaloo, Moy e Freymiller (2005) não revelou nenhum benefício na adição de PRP a FDDb ou FDMB, quando comparadas radiograficamente com a utilização exclusiva de FDDb ou FDMB.

Por outro lado, Dallari et al. (2006) observaram que a aplicação simultânea de PRP com células estaminais medulares (CEM) e de xenoimplante (osso liofilizado) em osteotomias do fémur distal foi superior a todas as combinações de dois destes elementos, sendo que os piores resultados foram obtidos para utilização exclusiva de PRP, mesmo considerando a utilização única de CEM ou de osso liofilizado. Hakimi et al. (2010) encontraram um efeito positivo na utilização de PRP com osso autólogo para preenchimento de osteotomias da metáfise tibial em porcos miniatura, comparando com a utilização exclusiva de auto-enxerto. Explicitamente, Malhotra et al. (2013) encontraram maior evidência científica na literatura para a utilização de concentrados de plaquetas como adjuvantes de matrizes ósseas sintéticas (MOS). Esses mesmos autores consideram que a bibliografia prova que o PRP poderá conferir algum grau de osteoindução a materiais inertes, unicamente osteocondutivos como as MOS, das quais se citam a hidroxiapatite e outros derivados (Malhotra et al., 2013). Malhotra et al. (2013) deixam assim a recomendação para a utilização de PRP com MOS, em detrimento da utilização única de MOS como material de enxerto para defeitos ósseos. Contudo, embora reconheçam o potencial teórico do PRP, os autores concluem que não existe na literatura evidência suficiente para a utilização de concentrados de plaquetas com osso autólogo, heterólogo ou com xenoimplantes.

Existem, porém, estudos bem conduzidos que encontraram pelo menos algum benefício na utilização de PRP na ossificação de ossos longos. Kanthan, Kavitha, Addi, Choon e Kamarul (2011) publicaram um estudo em que avaliavam os efeitos da utilização de PRP em defeitos ósseos criados cirurgicamente em coelhos. Numa primeira fase, os investigadores

removeram uma secção de 2 cm de comprimento da diáfise da tíbia (incluindo perióstio), utilizando soro para evitar o sobreaquecimento durante o corte e a consequente osteonecrose. A tíbia foi então estabilizada com placas de 2,7 mm e a osteotomia criada foi preenchida intracirurgicamente com metacrilato, criando-se assim condições de não-união. Para produção de PRP, foram colhidos 10 ml de sangue de cada animal, sujeitos a uma centrifugação inicial de 20 minutos a 150 g, seguida de uma segunda centrifugação de 450 g durante 10 minutos, da qual resultou um produto final de PRP equivalente a 1 ml. As concentrações plaquetárias do produto final eram bastante variáveis, assumindo valores entre 2,62 a 4,61 vezes superiores aos das contagens plaquetárias iniciais dos dadores. Os coelhos eram então submetidos a uma segunda cirurgia em que se lhes removia o enchimento de metacrilato da tíbia, optando-se então por um de quatro métodos de enchimento da osteotomia: no grupo A, nenhum material de enchimento foi usado; no grupo B apenas PRP foi utilizado; no grupo C apenas osso sintético (Coragraft®) foi usado e no grupo D usou-se PRP e Coragraft® em simultâneo. O Coragraft® é um material meramente osteocondutor feito à base de corais duros cultivados para o efeito, o que permitiria assim avaliar a presença de osteoindução como sendo resultante exclusivamente da adição de PRP (Kanthan et al., 2011).

Após exame radiográficos repetidos e exame histológico, o grupo D foi o que evidenciou a formação de um calo ósseo mais sólido, com maior integração dos fragmentos de Coragraft®, com maior radiopacidade e, histologicamente, apresentou maior formação de matriz mineralizada, deposição de cálcio e maior actividade osteogénica. Embora tivesse sido observada uma diferença significativa entre a utilização exclusiva de PRP e a não utilização de nenhum método de preenchimento da osteotomia, a única vantagem absoluta pela adição de PRP foi conseguida por utilização conjunta com osso sintético. Neste estudo, o PRP conferiu objectivamente uma capacidade osteoindutora a uma matriz mineral sintética (Coragraft®) que não era senão osteocondutora, o que vem de encontro ao concluído por Malhotra et al. (2013).

Todavia, é de realçar que embora recente, a revisão bibliográfica supracitada (Malhotra et al., 2013) não faz uma única referência a nenhuma das formas de fibrina rica em plaquetas, mencionando apenas PRP e sem fazer nenhuma distinção entre os variados protocolos para produção de PRP que existem actualmente. O criticismo feito por algumas correntes da comunidade científica aos concentrados de plaquetas, nomeadamente aos PRP's, será posteriormente abordado nesta dissertação no âmbito da discussão.

4. A TIBIAL TUBEROSITY ADVANCEMENT (TTA) COMO MODELO PARA OSTEOGÉNESE

A ruptura do ligamento cruzado cranial RLCC, apelidada por alguns de doença do ligamento cruzado cranial, é uma das causas mais comuns de alterações ortopédicas em cães. Numerosas técnicas cirúrgicas correctivas foram desenvolvidas nas últimas décadas com vista à correcção da RLCC, dividindo-se as técnicas entre três classificações possíveis: extracapsulares, intracapsulares e as osteotomias. As primeiras utilizam mecanismos que limitam a amplitude de movimentos e o ângulo da relação femoro-tibial, mimetizando assim a função do ligamento sem se proceder à sua substituição exacta. As técnicas intracapsulares procuram substituir o ligamento cruzado cranial (LCC), repondo assim a sua função (Hoffmann et al., 2006).

A TTA é uma técnica de osteotomia que assenta no princípio biomecânico de que a propagação da força compressiva femoro-tibial (que é estabilizada em parte pelo LCC) segue um vector que tem a mesma magnitude, a mesma direcção e o mesmo sentido que a força que é exercida no tendão patelar quando em carga. Esse vector direcciona-se cranialmente ou caudalmente quando o joelho é submetido a extensão ou flexão respectivamente. Assim, determinou-se que a estabilidade da articulação femoro-tibial dependeria de um ângulo entre o planalto tibial e o ligamento patelar muito próximo dos 90°. Verificou-se então que a correcção deste ângulo para um valor de 90°, em animais diagnosticados com RLCC, permitia a resolução clínica da instabilidade articular que conduzia ao deslizamento tibial cranial patológico (Boudrieau, 2009).

Para realização de uma TTA, o primeiro passo consiste num estudo radiográfico pré-cirúrgico com uma projecção médio-lateral do membro afectado, que se posiciona com uma extensão semelhante à que se obtém quando o animal está em estação (ângulo de 135° entre as linhas que passam nos eixos longos de tibia e fémur). É então que se estabelecem as dimensões dos implantes a colocar para que se corrija o ângulo tibio-patelar, de forma a atingir os 90° pretendidos (Boudrieau, 2009).

A técnica cirúrgica consiste numa exposição craniomedial da crista da tibia, por incisão ao longo da porção caudal do músculo sartório e da aponevrose de inserção dos músculos grácil, semitendinoso e semimembranoso (ilustração 7). A incisão deverá estender-se desde a crista da tibia até à diáfise tibial. É rebatido o periósteo da crista da tibia, numa área grande o suficiente para abarcar tanto a osteotomia que se pretende fazer como a placa que se pretende utilizar (ilustração 9). A osteotomia a realizar (perpendicular ao plano sagital e paralela ao plano frontal) inicia-se imediatamente cranial ao menisco medial até à porção distal da crista da tibia (ilustração 10). A placa é então posicionada (ilustração 11) de maneira a que se sobreponha à crista da tibia (paralelamente ao seu bordo cranial) e que a parte distal da placa esteja ligeiramente cranial ao eixo longo central da tibia para se garantir

que, quando se levar a cabo o avanço e ligeira rotação da crista da tibia, os orifícios dos parafusos distais estejam colocados sobre o centro da diáfise da tibia. Aplica-se então uma guia de oito buracos específica para o efeito (Kyon[®]), paralela ao bordo cranial da crista da tibia e com a extremidade cranial junto à inserção do tendão patelar, fazendo-se as perfurações correspondentes aos orifícios da placa que se pretende depois aplicar. Seguidamente, a placa é posicionada na sua disposição final fixada por um garfo, utilizando-se para o efeito um martelo ortopédico e uma guia específica (Kyon[®]) que tem um entalhe que corresponde à superfície do tal garfo, permitindo assim que se mantenha em posição enquanto a placa é apertada na sua posição final. De seguida, usa-se uma pega em T específica (Kyon[®]), rodando-a para abrir a osteotomia feita e criar espaço que será estabilizado pela colocação de uma caixa, dobrando-se as duas orelhas da caixa de maneira a que repousem perfeitamente na superfície da tibia. A caixa é aparafusada à tibia (evitando a perfuração do espaço articular do joelho) e os orifícios distais da placa são estabilizados com recurso a parafusos. A crista da tibia assume assim a sua posição final, garantindo-se que a sua extremidade caudal mantém o contacto com a metáfise tibial. É criada desta forma uma osteotomia (ilustração 12) com a configuração de prisma triangular, que se pretende que ossifique o mais rapidamente possível, permitindo assim a estabilização definitiva dos implantes e a manutenção de um ângulo tibio-patelar de 90° (Lafaver, Miller, Stubbs, Taylor e Boudrieau, 2007).

Esta osteotomia, que ossifica por segunda intenção, constitui um modelo ideal para estudos de ossificação ou até de utilização de diferentes materiais ortopédicos de enxerto. Primeiramente, é uma osteotomia com uma forma regular, contrastando com os defeitos ósseos que se geram no caso de fracturas ósseas traumáticas que pela sua irregularidade impossibilitam a repetibilidade das condições de cicatrização óssea. Em segundo lugar, é criada em condições de assepsia cirúrgica, descartando-se assim o papel adverso que a infecção tem no âmbito da cicatrização de tecidos. Essa infecção pode ocorrer tanto por exposição ambiental do foco de fractura óssea como por necrose extensa dos tecidos na região traumatizada, algo que na técnica de TTA se exclui à partida. Em terceiro lugar, não é eticamente questionável nem má prática cirúrgica que se deixe a osteotomia criada pela técnica de TTA cicatrizar por segunda intenção, sendo mesmo esse o propósito da intervenção cirúrgica. É importante referir que o preenchimento da osteotomia com algum tipo de enxerto constitui um tema actual de debate, não deixando o objectivo de ser a cicatrização por segunda intenção (Boudrieau, 2011). Seguramente que tal não seria sempre possível na abordagem da maioria das fracturas ósseas. Outra das vantagens explícitas da utilização da TTA como modelo é a repetibilidade do defeito ósseo criado, algo que nas fracturas espontâneas de ossos longos é impossível atingir visto serem todas diferentes. Por último, a osteotomia criada é facilmente monitorizada por projecções radiográficas médio-laterais em que, se o posicionamento for o correcto, toda área da

osteotomia é observável, não ocorrendo nenhuma sobreposição de material mais radiopaco que poderia dificultar a constatação da progressão da radiopacidade inerente à formação de osso no local da osteotomia. Não obstante, existe alguma divergência de opiniões relativamente à utilidade da radiologia como método de monitorização da cicatrização óssea (Walsh et al., 2003).

Por todas as razões supramencionadas, a osteotomia criada pela técnica de TTA foi a escolhida como meio de monitorização dos efeitos da aplicação de L-PRF na cicatrização óssea por segunda intenção em cães. Essa decisão criou a necessidade de sucintamente descrever nesta dissertação, os princípios por detrás da realização desta técnica assim como os principais passos do processo cirúrgico.

5. A CICATRIZAÇÃO ÓSSEA POR SEGUNDA INTENÇÃO

Assim como acontece com os restantes tipos de tecidos, a cicatrização óssea comporta três fases clássicas: uma fase inicial inflamatória, uma fase intermédia de regeneração ou reparação, concluindo com uma fase de remodelação.

Assim que se cria uma solução de continuidade no tecido ósseo, há comprometimento vascular que conduz a uma hemorragia local e ao aparecimento de um hematoma, que marca o início da fase inflamatória. Esta fase rege-se por um afluxo local de células inflamatórias que segregam citocinas como a IL-1, IL-6, o PDGF ou o TGF- β 1, cujas funções já foram brevemente descritas nesta revisão bibliográfica (Fossum et al., 2007). Estes factores são quimiotácticos e despoletam o início da segunda fase de cicatrização, a regenerativa, ao provocarem o influxo de numerosas células mesenquimatosas oriundas do endóstio e perióstio, assim como dos tecidos moles circundantes. Essas células irão posteriormente diferenciar-se em fibroblastos, condroblastos e osteoblastos que darão origem a tecido fibroso, cartilágneo e ósseo, respectivamente. Esta proliferação e diferenciação celular é inevitavelmente acompanhada por angiogénese, dando origem a um tecido a que se dá o nome de tecido de granulação (Bliss, Rawlinson & Todhunter, 2012). Esta é a fase sobre a qual as plaquetas, os leucócitos e os factores de crescimento e citocinas (plaquetários, leucocitários e não só) exercem grande influência. O propósito dos manipulados de L-PRF será então o de incrementar o número de elementos celulares e moleculares contributivos para esta fase, levando a uma cicatrização mais rápida mas histologicamente igual, sendo máximo o ganho final de função e morfologia.

O defeito ósseo vai sendo progressivamente preenchido com tecidos de maior resistência mecânica, com o propósito de ir estabilizando a estrutura óssea afectada para que possa recuperar a sua função. O primeiro tipo de tecido a garantir alguma estabilidade é o tecido de granulação que se forma ao fim de 3 a 4 dias. À medida que este tecido sofre maturação, vai dando lugar a tecidos com maior rigidez, vulgarmente designados por calo ósseo. Este

calo é inicialmente formado por fibras de colagénio que se vão tornando mais densas e organizadas com o tempo, resultando num tecido cada vez menos elástico. Essa progressiva diminuição da elasticidade do tecido leva à substituição do tecido conjuntivo fibroso por tecido cartilágneo, que é por fim substituído por osso trabecular através de ossificação endocondral. Alguns autores (Malhorta et al., 2013) subdividem por isso esta fase de reparação ou regeneração em dois momentos distintos: a formação de um calo ósseo brando inicial e a formação consecutiva de um calo ósseo rígido.

Tabela 2 – Relação entre as fases da ossificação endocondral e diversos factores de crescimento (adaptado de Malhorta et al., 2013; tradução livre).

Dia	Fases da ossificação endocondral	Acção	Citoquinas pro-inflamatórias	PDGF	FGF	TGF	VEGF	HGF	IGF
0	Momento da lesão	Formação do hematoma							
1-3	Resposta inflamatória	Inflamação							
		Quimiotaxia de CE							
3-14	Formação do calo ósseo brando	P/D das CE (condrogénica)							
		Angiogénese							
		Proliferação de condrócitos							
14-21	Calcificação	Hipertrofia dos condrócitos							
21-30	Formação do calo ósseo rígido	Angiogénese							
		P/D das CE (osteogénica)							
30+	Remodelação óssea	Formação de matriz e remodelação							

CE: células estaminais; P/D: proliferação/ diferenciação; PDGF: factor de crescimento derivado das plaquetas (isoformas AA, AB e BB); FGF: factor de crescimento dos fibroblastos; TGF: factor de crescimento transformante (isoformas B1, B2 e B3); VEGF: factores de crescimento do endotélio vascular; HGF: factor de crescimento dos hepatócitos; IGF: *insulin-like growth factor*

	Intervenção directa
	Intervenção possível/ indirecta

Durante a fase final de remodelação (que poderá durar anos), o osso trabecular criado é gradualmente substituído por osso medular, num processo a que se dá o nome de remodelação de Havers (*Haversian remodeling*) e que culmina com a restituição do canal medular e substituição de todo o tecido cicatricial formado no processo (Bliss et al., 2012).

6. ENSAIO CLÍNICO

6.1. Material e métodos

Neste trabalho pretendeu-se fazer a comparação radiográfica e clínica entre a utilização exclusiva de osso esponjoso autólogo com a utilização mista de osso esponjoso autólogo e fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) na cicatrização do espaço criado pela osteotomia realizada na técnica de TTA. O desenho experimental foi submetido à Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa para aprovação, pedido esse que foi formalmente deferido.

6.1.1. Critérios de inclusão de casos

Neste estudo, cada joelho com diagnóstico definitivo de ruptura de ligamento cruzado cranial operado pela técnica de TTA representará uma unidade experimental. Foram excluídos todos os animais com anomalias de coagulação comprovadas, alterações hematológicas reconhecidas no hemograma pré-cirúrgico ou com doença de fundo que possa interferir também com o processo de coagulação. Foram excluídos assim os pacientes:

- Com diagnóstico ou suspeita, prévios ou posteriores, de hipotireoidismo, hiperadrenocorticism, *Diabetes mellitus* ou outra endocrinopatia.
- Que sejam alvo de corticoterapia ou imunoterapia (imunossupressora ou modeladora), vitalícia ou nos 3 meses que antecederam ou que se seguiram à cirurgia.
- Que no grupo controlo tenham desenvolvido complicações pós-cirúrgicas.
- Que não tenham um peso superior a 15 kilogramas.
- Que não tenham feito pelo menos dois controlos radiográficos pós-cirúrgicos, às 4 e às 8 semanas de pós-operatório.
- Que em ambos os grupos tenham desenvolvido complicações pós-cirúrgicas que reconhecidamente não tenham relação possível com a ossificação da osteotomia ou com aplicação de L-PRF. A título de exemplo citam-se granuloma por lambedura da sutura, seroma da região incisionada, posicionamento incorrecto dos implantes ou fractura precoce dos implantes com migração dos mesmos (Wolf, Scavelli, Hoelzler, Fulcher & Bastian, 2012).

O grupo de teste foi constituído por todos os pacientes com diagnóstico clínico e radiográfico de ruptura do ligamento cruzado cranial, realizado no hospital Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (HE-FMV), sujeitos a TTA entre Janeiro de 2013 e Julho de 2013, com aplicação bem sucedida de L-PRF na osteotomia de TTA.

Para grupo de controlo, ou seja, como representantes dos casos em que na osteotomia de TTA apenas foi feito autoenxerto de osso esponjoso da tibia, recorreu-se ao historial de pacientes abordados dessa forma no HE-FMV, entre Janeiro de 2011 e Janeiro de 2013, período no qual está documentada a realização de 69 TTA's.

6.1.2. Procedimento de preparação e implantação do L-PRF

Para aplicação do L-PRF em conjunto com osso esponjoso autólogo da tibia, o animal foi preparado assepticamente para cirurgia tendo sido a técnica realizada na totalidade segundo a forma descrita por Montavon, Damur e Tepic (2002). Na fase de preparação pré-cirúrgica foi feita uma tricotomia na região do pescoço, sobreponível com a goteira jugular para que em tempo cirúrgico se fizesse a lavagem asséptica da zona com clorhexidina a 4%. Após lavagem, e depois de a osteotomia ter sido feita e enquanto os implantes da osteossíntese são aplicados, foi colhido sangue da veia jugular. A colheita foi feita com recurso a uma borboleta Vacuette® com adaptador luer (estéril), com um sistema de 19 cm e agulha de 21 G ou 23 G, de 3/4" de comprimento (ilustrações 3, 4 e 5) com a qual se fez a punção e à qual se acoplou um tubo de vácuo para soro (vermelho/preto) Vacuette® de 9 mL com cápsula não roscada, de dimensões 16x100 mm (ilustração 6). A acoplagem foi mediada por um adaptador *holder* Vacuette® para agulha em vácuo (versão curta). Após punção, a borboleta foi mantida em posição enquanto se enchem o número de tubos que se julgar necessário, à vez e garantindo sempre a assépsia dos procedimentos. A borboleta foi retirada e foi aplicada pressão local para garantir a hemostase enquanto se centrifuga imediatamente os tubos de sangue obtidos, durante 14 minutos a 700 g. Para centrifugação usou-se uma centrífuga Hettich® de cuvetes giratórias. De seguida, os coágulos foram extraídos assepticamente dos tubos para uma placa de Petri, onde lhes foi removida a extensão de glóbulos vermelhos aderentes (exceptuando os 3 mm adjacentes ao coágulo de fibrina), cortados em fragmentos menores para posterior aplicação na osteotomia, juntamente com o osso esponjoso extraído da tibia previamente. Foi feita a aspiração asséptica com seringa do depósito líquido que resulta da manipulação dos coágulos na placa, que foi depois aspergido sobre a osteotomia já preenchida com ambos os materiais de autoenxerto. Por fim, realizou-se a aproximação dos vários planos de tecidos e o encerramento da ferida cirúrgica segundo a técnica descrita para a TTA.

No grupo controlo, a técnica cirúrgica foi exactamente a mesma com a excepção de que a osteotomia foi preenchida com osso esponjoso extraído da metáfise tibial por curetagem.

Ilustração 3 – sistema de colheita estéril Vacuette® (fotografia original)



Ilustração 4 – Pormenor da borboleta Vacuette® com adaptador luer (fotografia original)



Ilustração 5 – Pormenor do adaptador *holder* Vacuette® (fotografia original)



Ilustração 6 – tubo de vácuo para soro (vermelho/preto) Vacuette® (fotografia gentilmente cedida pela Vacuette Portugal)



Ilustração 7 – incisão na face medial do membro posterior (fotografia original)



Ilustração 8 – acesso ao espaço articular (fotografia original)

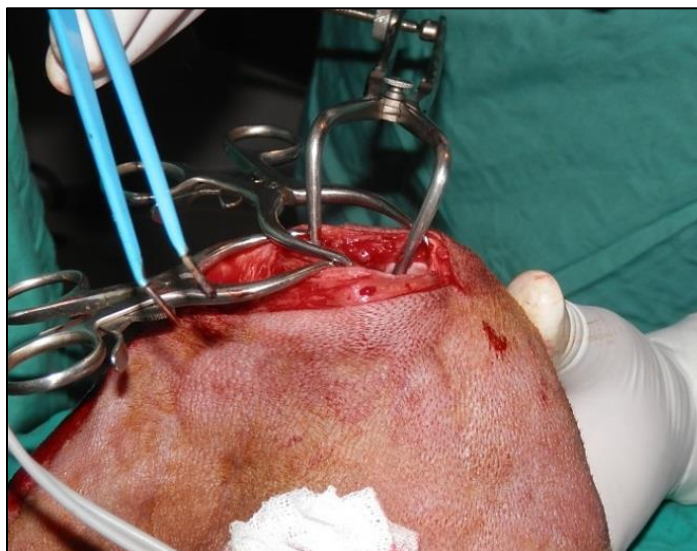


Ilustração 9 – desbridamento e exposição da crista da tíbia (fotografia original)



Ilustração 10 – início da realização da osteotomia (fotografia original)

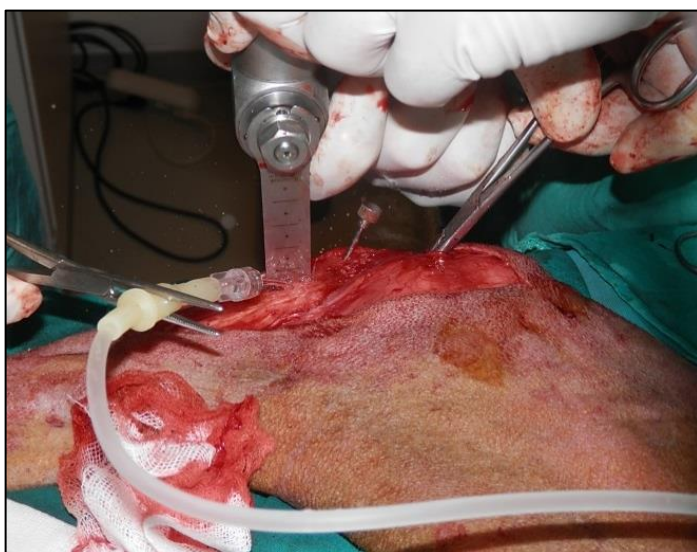


Ilustração 11 – fixação da osteotomia com placa e caixa (fotografia original)

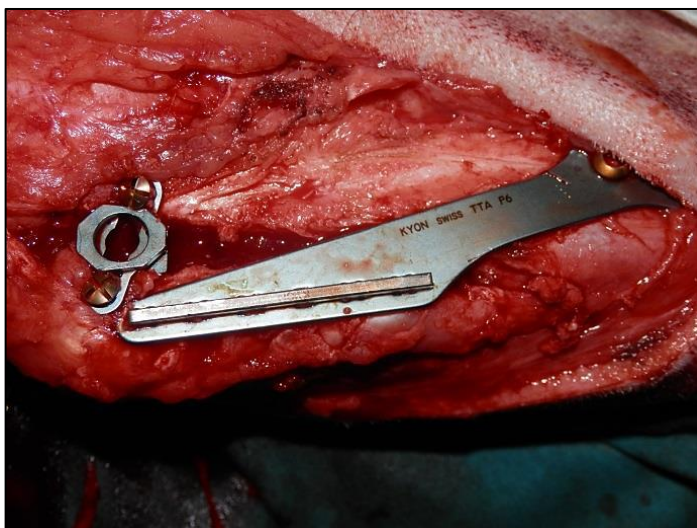


Ilustração 12 – osteotomia fixada e preenchida (fotografia original)

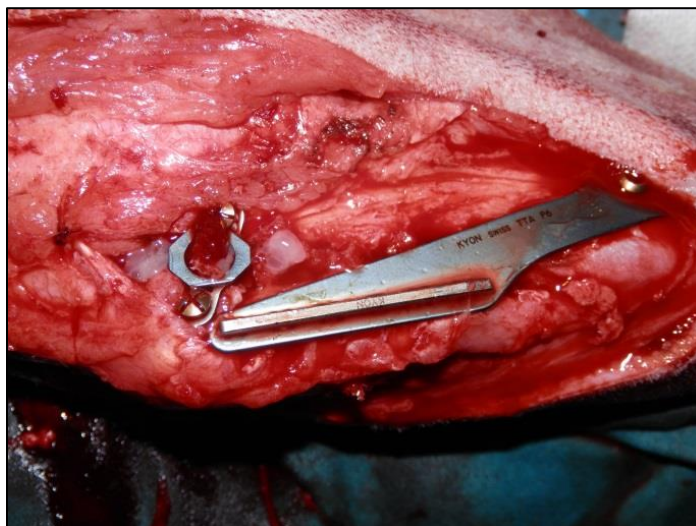


Ilustração 13 – tubos de soro contendo L-PRF, após centrifugação (fotografia original)

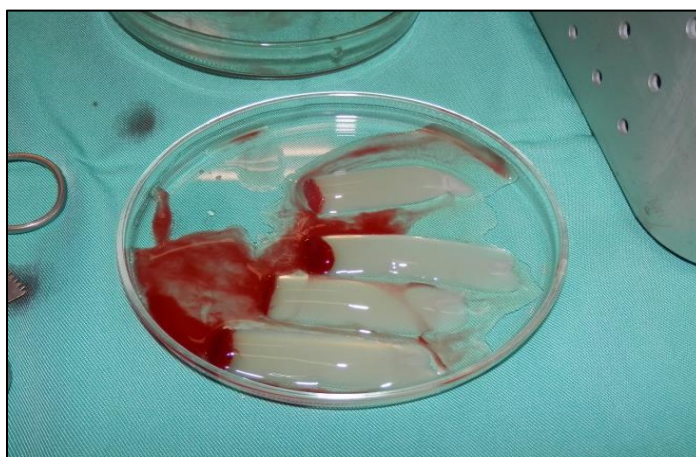


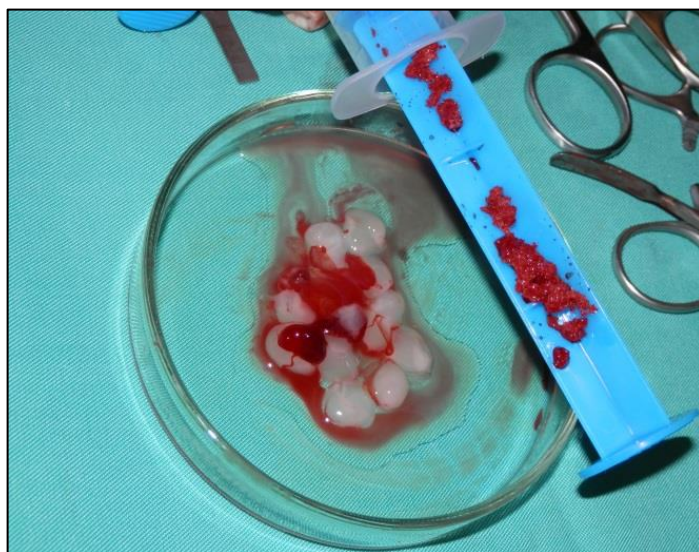
Ilustração 14 – coágulos de L-PRF em placa de Petri após extracção do tubo (fotografia original)



Ilustração 15 – corte dos coágulos para posterior mistura com osso esponjoso autólogo (fotografia original)



Ilustração 16 - posterior mistura com osso esponjoso autólogo (fotografia original)



6.1.3. Estudo radiográfico

A avaliação e classificação da velocidade de ossificação do espaço criado pela osteotomia foi feita utilizando uma escala (Hoffmann et al., 2006) que avalia a ossificação entre crista da tibia e metáfise da tibia em três pontos predefinidos: na zona cranial à caixa de TTA, na zona distal à caixa e proximal ao bordo proximal da placa de TTA e na zona distal ao bordo distal da placa de TTA. A primeira escala, validada noutro estudo, integra 5 classificações possíveis: 0 = não houve ossificação; 1 = formação óssea precoce sem criação de pontes ósseas entre a crista da tibia e a metáfise da tibia; 2 = ponte óssea formada numa das localizações predefinidas; 3 = pontes ósseas formadas em duas das localizações predefinidas; 4 = pontes ósseas formadas em todas as localizações predefinidas.

Existem publicações análogas, em que dois materiais de autoenxerto foram comparados segundo a mesma escala de ossificação. O trabalho de Kuipers von Lande et. al (2011) comparou a utilização de osso esponjoso autólogo com um xenoimplante obtido a partir de bovino processado. Foram incluídos 82 cães com ruptura parcial ou completa do ligamento cruzado cranial, sendo que em 48 se usou osso hexólogo bovino processado e nos restantes 34 foi usado osso esponjoso autólogo. Guerrero et. al (2011) fizeram um estudo no qual primeiramente comparavam a utilização de osso esponjoso autólogo (que constituiu o grupo de controlo) com o não preenchimento da osteotomia, preservando apenas o coágulo que se formava no seu interior. Nesse mesmo estudo, 14 cães constituíam o grupo de controlo e outros 14 constituíam o grupo experimental. O trabalho realizado por Bisgard et. al (2011) compara a utilização de osso esponjoso autólogo com um novo desenho de placa de TTA. No mesmo estudo, foram constituídos quatro grupos experimentais, cada um englobando 15 indivíduos.

No presente estudo, essa avaliação foi feita por dois operadores, membros do corpo clínico do HE-FMV e docente da área de Radiologia. As radiografias foram numeradas aleatoriamente para permitir a omissão da sua data de realização e entregues para avaliação dos dois operadores, que procederam à sua avaliação alheios ao tipo de enxerto utilizado.

6.1.4. Estudo histológico dos coágulos de L-PRF

Foi feita a observação histológica por microscopia óptica de dois coágulos, colhidos de dois pacientes distintos, para corroboração da estrutura histológica obtida nos estudos de Li et al. (2013) e Ehrenfest et al. (2010a). Resultados semelhantes aos já obtidos e publicados pela utilização de L-PRF em humanos, só seriam atingidos garantindo que o coágulo produzido pela aplicação do protocolo de Choukroun em cães possuía uma estrutura histológica idêntica ao pretendido. Para tal, os dois coágulos foram embebidos em formol a 10% logo após a sua produção. Mais tarde, foram incluídos em parafina e sujeitos a cortes longitudinais, obtendo-se assim lâminas representativas dos coágulos em toda a sua extensão. As lâminas foram primeiramente coradas com a coloração padrão, hematoxilina e eosina e posteriormente pelo tricrómio de Masson.

6.1.5. Questionário

Com o intento de complementar a informação conseguida através do estudo radiológico e histológico, foram conduzidos questionários aos donos dos animais incluídos no grupo de teste. Pretendeu-se que o questionário utilizado fosse sucinto e objectivo, caracterizando

tanto a satisfação dos donos com o procedimento assim como a evolução clínica dos pacientes.

6.1.6. Análise matemática dos resultados obtidos no estudo radiológico

Antes de se dar início ao ensaio clínico, foi planeado o tratamento estatístico a dar aos dados obtidos. Para atestar a homogeneidade dos grupos no que toca a idade, peso, tamanho da caixa, tamanho da placa e data de realização do controlo, optar-se-ia por testes de T-Student para avaliar a tendência central e a razão de variâncias (Teste F de Fisher) para avaliar a dispersão. Para avaliação da diferença obtida entre os scores de ambos os grupos e respectiva correlação dos scores obtidos por grupo com data do controlo e método de enxertia, usar-se-ia planeamento factorial completo (two-way ANOVA) com dois factores a dois níveis, o que permitiria estudar cada um dos factores (data do controlo e plano de enxertia da osteotomia) e também a interacção entre eles. Dever-se-iam utilizar, para cada uma das experiências, um número de réplicas que permitisse estimar o termo do erro. Para que tal fosse possível, o número de réplicas por experiência não deveria ser inferior a 5. Neste sentido, e atendendo a que o planeamento estabelecido comporta a realização de quatro experiências, o número de casos a estudar não deveria ser inferior a 20.

A análise estatística dos resultados do trabalho prático visava dar resposta à seguinte pergunta: Será a velocidade de ossificação da osteotomia criada maior quando é utilizado L-PRF em conjunto com osso esponjoso da tíbia, quando comparado com a utilização exclusiva de osso esponjoso?

Nesse âmbito, haveria duas hipóteses a serem testadas:

A. Hipóteses nula

A velocidade de ossificação da osteotomia criada é menor ou igual quando é utilizado L-PRF em conjunto com osso esponjoso da tíbia, quando comparado com a utilização exclusiva de osso esponjoso.

B. Hipótese alternativa

A velocidade de ossificação da osteotomia criada é maior quando é utilizado L-PRF em conjunto com osso esponjoso da tíbia, quando comparado com a utilização exclusiva de osso esponjoso.

A cada uma das hipóteses supracitadas, corresponderiam as previsões de seguida enumeradas.

A. A velocidade de ossificação da osteotomia criada é menor ou igual quando é utilizado L-PRF em conjunto com osso esponjoso da tíbia, quando comparado com a utilização exclusiva de osso esponjoso.

Neste caso o valor de p seria maior que 0,05 e aceitar-se-ia a hipótese nula. Assim,

verificar-se-ia que não existe nenhum incremento na velocidade de ossificação da osteotomia pelo acréscimo de L-PRF, quando comparado com a utilização exclusiva de osso esponjoso autógeno. Consequentemente, a colheita de sangue para preparação de L-PRF torna-se desnecessária e o procedimento é simplificado. Estudos de tipo histológico seriam necessários para confirmar se a qualidade do osso neoformado seria idêntica utilizando ou não L-PRF.

B. A velocidade de ossificação da osteotomia criada é maior quando é utilizado L-PRF em conjunto com osso esponjoso da tíbia, quando comparado com a utilização exclusiva de osso esponjoso.

Neste caso o valor de p seria menor que 0,05 e rejeitar-se-ia a hipótese nula. Assim, verificar-se-ia que existe efectivamente um incremento na velocidade de ossificação da osteotomia pelo acréscimo de L-PRF, quando comparado com a utilização exclusiva de osso esponjoso autógeno. Consequentemente, a colheita de sangue para preparação de L-PRF tornar-se-ia uma mais-valia e o ganho de função pretendido será atingido mais rapidamente. Estudos de tipo histológico seriam necessários para confirmar se a qualidade do osso neoformado seria idêntica utilizando ou não L-PRF.

Contudo, a casuística limitada permitiu apenas uma análise meramente gráfica das classificações obtidas pelas radiografias de seguimento.

7. RESULTADOS

7.1. População em estudo

Após o preenchimento de todos os critérios de inclusão descritos previamente neste documento, o Grupo de Teste incluía 9⁴ TTA's em 8 pacientes diferentes. Por sua vez, o Grupo Controlo compreendia 8 TTA's em 7 pacientes diferentes (n = 17).

Tabela 3 – Caracterização demográfica e da técnica cirúrgica envolvida na abordagem ao Grupo de Teste

Grupo de Teste									
Raça	Data de Nascimento	Peso (Kg)	Data da cirurgia	Joelho	Caixa	Placa	Minutos	g	Coágulos
Boxer	24-06-2009	54	21-03-2013	Esquerdo	10,5x19	6L	12	700	4
Boxer	01-01-2012	27,2	28-03-2013	Direito	9x19	5L	12	700	2
Beagle	03-05-2011	15,8	16-05-2013	Direito	6x13	4	12	700	2
Weimaraner	01-01-2010	42	23-05-2013	Direito	9x19	6L	14	700	1
Boxer	01-01-2007	38	04-06-2013	Direito	9x22	6	14	700	2
Labrador	24-08-2006	30,1	05-06-2013	Direito	7,5x19	5	14	700	2
Golden	01-01-2008	37,2	06-06-2013	Direito	9x22	6	14+2	700	2
Boxer	01-01-2012	27,2	16-06-2013	Esquerdo	9x19	5	15	700	2+1
Setter Irlandês	16-08-2010	22,6	26-06-2013	Direito	9x19	6L	14	700	2+1

Tabela 4 – Caracterização demográfica e da técnica cirúrgica envolvida na abordagem ao Grupo Controlo

Grupo Controlo						
Raça	Data de Nascimento	Peso (Kg)	Data da cirurgia	Joelho	Placa	Caixa
Castro Labreiro	14-02-2009	39	09-03-2011	Esquerdo	6L	12x22
Labrador		37,5	14-03-2011	Direito	5	10,5x19
Rafeiro Alentejano	01-01-2008	40	21-03-2011	Esquerdo	6	12x22
Dogue Alemão	05-05-2008	60	23-03-2011	Direito	8	12x22
C. Gado Transmontano	17-07-2008	55	20-09-2011	Esquerdo	7	12x22
Indefinida	01-01-2001	26,4	06-02-2012	Direito	5	9x19
Labrador	01-01-2005	32,1	05-04-2012	Esquerdo	5	10,5x22
C. Gado Transmontano	17-07-2008	55	24-10-2012	Direito	7	12x22

⁴ No Grupo de Teste, 2 das 9 TTA's não foram sujeitas a comparação radiográfica por incumprimento ou não-conformidade do seguimento radiográfico.

7.2. Estudo radiográfico

Os resultados das avaliações radiográficas obtidas pelos Operadores A e B foram agrupados por operador e por momento do controlo radiográfico, comparando para o mesmo momento da evolução pós-operatória, as radiografias dos elementos do Grupo de Teste e do Grupo Controlo.

Gráfico 3 – Comparação entre a classificação obtida pelas radiografias de controlo do Grupo Controlo e do Grupo de Teste, das 4 semanas de pós-operatório, atribuídas pelo Operador A

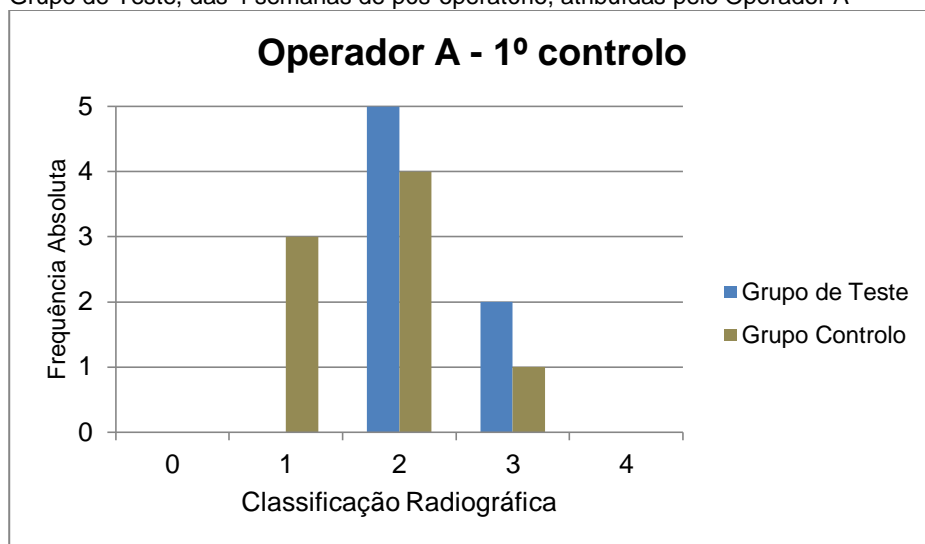


Gráfico 4 – Comparação entre a classificação obtida pelas radiografias de controlo do Grupo Controlo e do Grupo de Teste, das 8 semanas de pós-operatório, atribuídas pelo Operador A

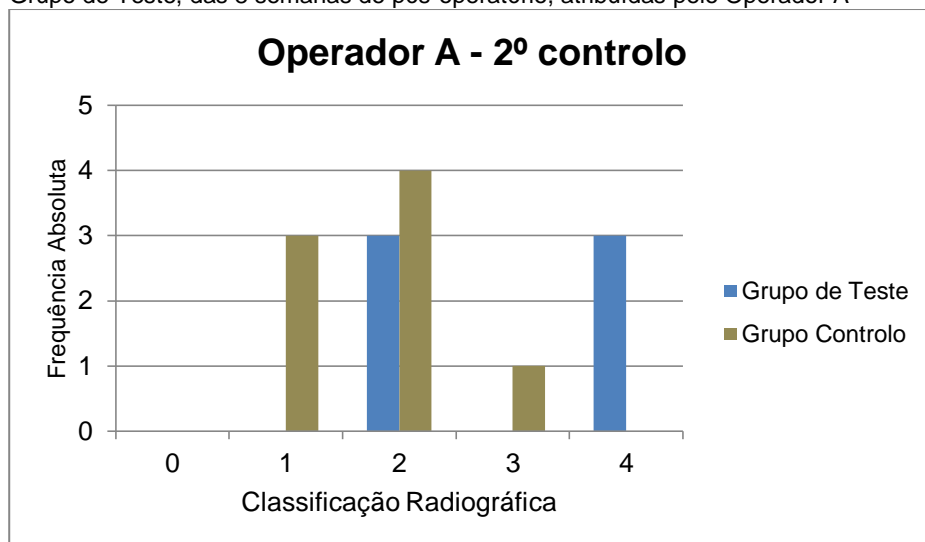


Gráfico 5 – Comparação entre a classificação obtida pelas radiografias de controlo do Grupo Controlo e do Grupo de Teste, das 12 semanas de pós-operatório, atribuídas pelo Operador A

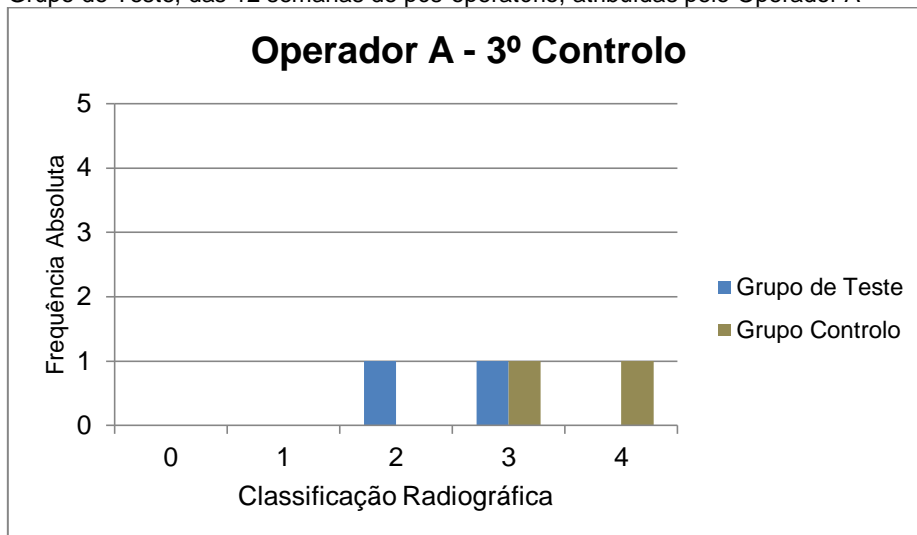


Gráfico 6 – Comparação entre a classificação obtida pelas radiografias de controlo do Grupo Controlo e do Grupo de Teste, das 4 semanas de pós-operatório, atribuídas pelo Operador B

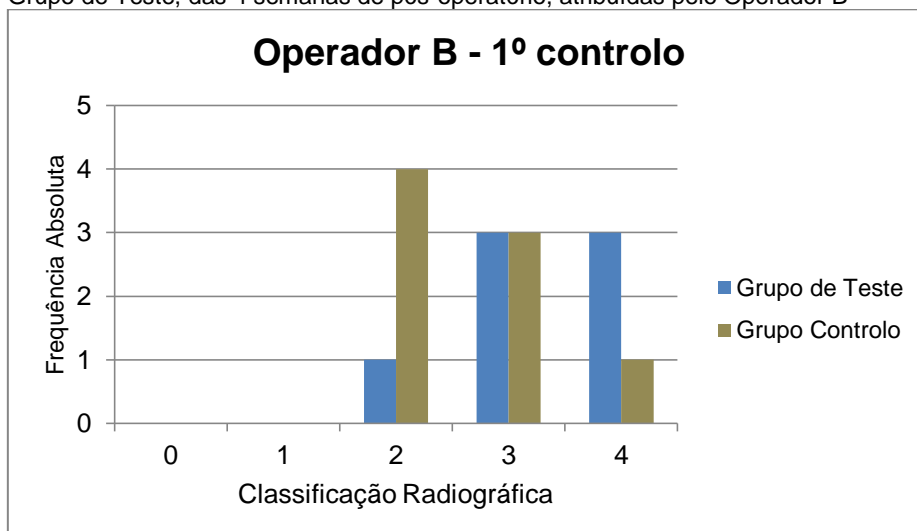


Gráfico 7 – Comparação entre a classificação obtida pelas radiografias de controlo do Grupo Controlo e do Grupo de Teste, das 8 semanas de pós-operatório, atribuídas pelo Operador B

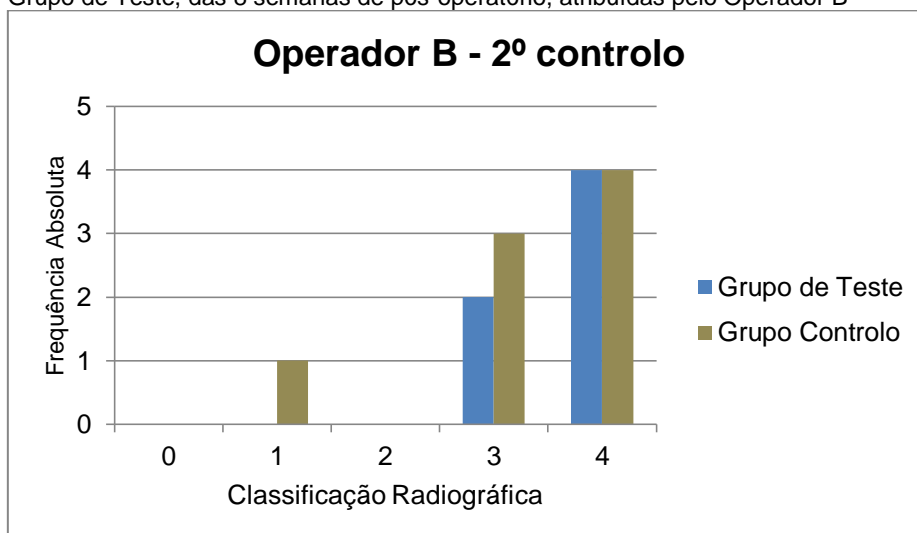
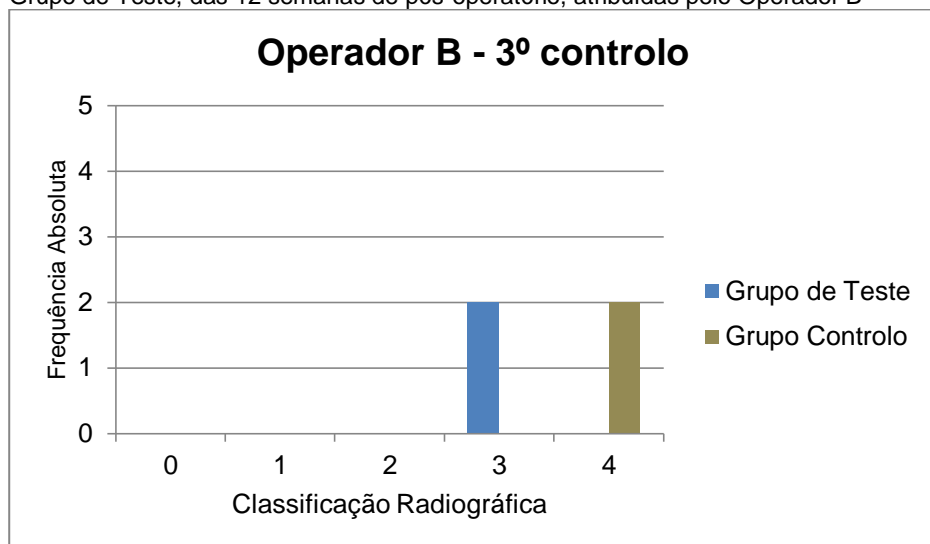


Gráfico 8 – Comparação entre a classificação obtida pelas radiografias de controlo do Grupo Controlo e do Grupo de Teste, das 12 semanas de pós-operatório, atribuídas pelo Operador B



7.3. Estudo histológico

Ilustração 17 – Corte histológico de um dos coágulos, corado pelo tricrômio de Masson, com ampliações de 40 e de 200 X (fotografia original)

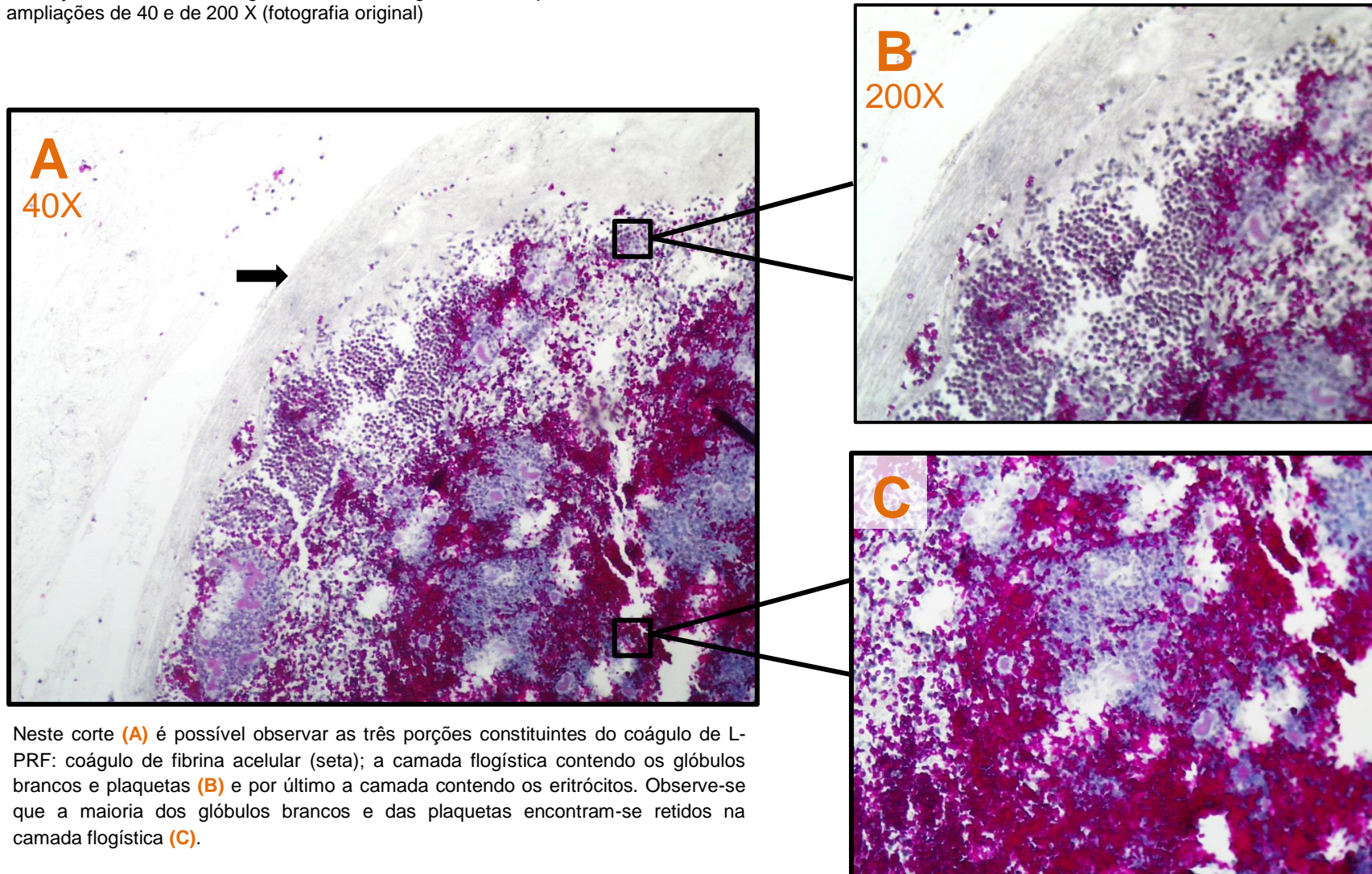


Ilustração 18 - Pormenor de um corte histológico de um dos coágulos, correspondendo à camada flogística, contendo abundante quantidade de glóbulos brancos e plaquetas. Coloração de Hematoxilina e Eosina, numa ampliação de 200 X.

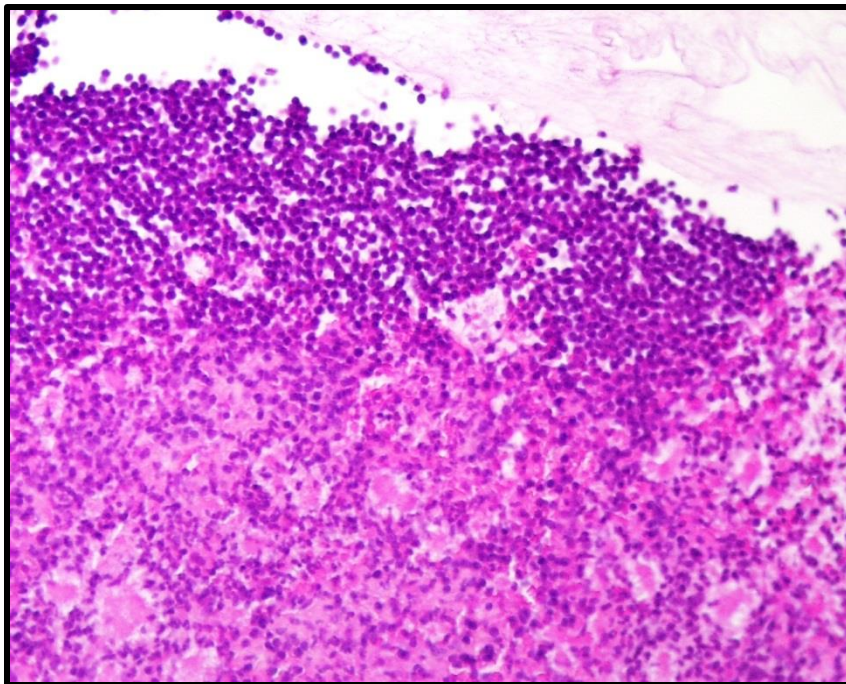
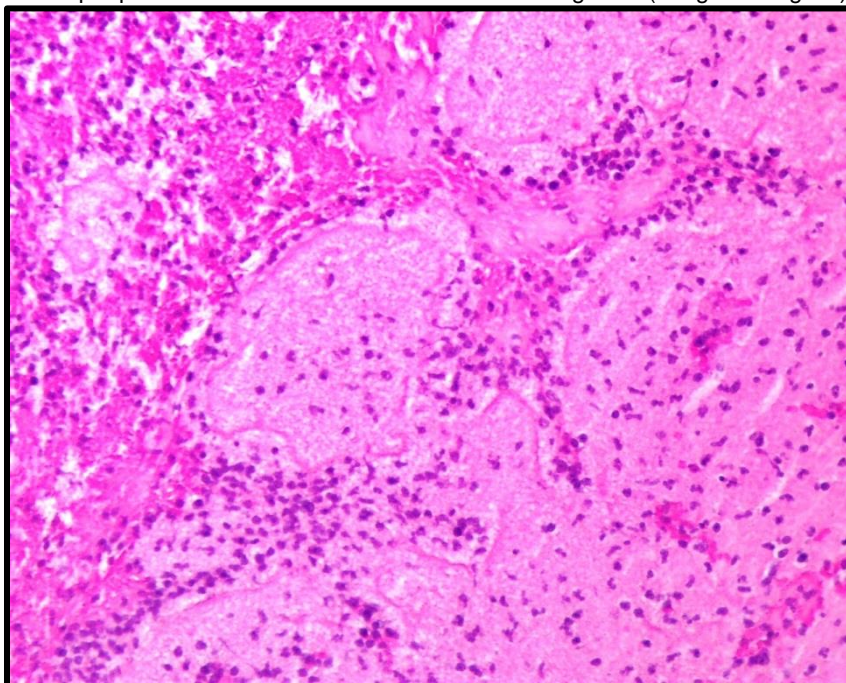


Ilustração 19 – Pormenor de um corte histológico de um dos coágulos, correspondendo à camada flogística, corado com a coloração de Hematoxilina e Eosina, numa ampliação de 200 X. Observe-se que a maioria dos glóbulos brancos e das plaquetas se encontram retidos na camada flogística (fotografia original).



8. DISCUSSÃO

8.1. Análise às críticas publicadas sobre concentrados de plaquetas em sentido lato e ao protocolo de Choukroun especificamente

A comunidade científica não é uníssona relativamente às vantagens dos concentrados de plaquetas no geral (Freymiller & Aghaloo, 2004), assim como no que respeita à utilização de L-PRF em particular.

Assim sendo, mais importante que uma análise individual à disparidade de resultados da aplicação de concentrados de plaquetas, publicados até hoje, parece ser a compreensão dos factores que estão na origem de tal discrepância. A avaliação da eficácia terapêutica da utilização de concentrados de plaquetas torna-se complexa pela miríade de técnicas disponíveis para a sua obtenção, técnicas essas que correspondem a produtos finais diferentes, com concentrações plaquetárias, celulares e moleculares necessariamente diferentes (Iqbal et al., 2011). Em 2004, Wasterlain, Braun e Dragoo documentaram a existência de pelo menos 16 sistemas de separação plaquetária para a obtenção de concentrados de plaquetas, com diferenças significativas nas quantidades relativas de eritrócitos, plaquetas, leucócitos e factores de crescimento. Os autores apontaram então para a dificuldade que representa a elaboração de generalizações sobre a utilidade dos concentrados de plaquetas com uma tão grande variedade de preparações comerciais para o efeito (Wasterlain et al., 2004).

Um dos principais pontos de discórdia sobre esta matéria é a concentração plaquetária final que se considera clinicamente útil (Dhillon et al., 2012). Estes concentrados baseiam-se na noção teórica de que será mais útil à cicatrização a aplicação de um material menos rico em glóbulos vermelhos (reduzidos a concentrações de cerca de 5%), cujo papel para a regeneração de tecidos é menos relevante, aumentando-se a concentração de plaquetas para valores a rondar os 95%, tendo estas um papel preponderante na cicatrização. Como tal, a maioria dos estudos que utilizam P-PRP ou L-PRP sugere que uma concentração de plaquetas 5 vezes superior à normal seria a indicada, não tendo sido encontrado benefício com a utilização de concentrações 6 vezes superiores ao normal (Dhillon et al., 2012). Contudo, o método de Choukroun para a produção de L-PRF utiliza uma concentração de plaquetas 2,5 vezes superior ao normal (Ehrenfest et al., 2009a), demonstrando resultados superiores aos obtidos com métodos de L-PRP e P-PRP sempre que se estabelece a comparação, conforme foi referido previamente nesta dissertação. Os resultados uniformemente positivos obtidos, *in vivo* e *in vitro*, com a aplicação de um concentrado de plaquetas desta natureza sugere que esta concentração 2,5 vezes superior à concentração normal possa estar próxima da concentração ideal de plaquetas, contrariando os valores próximos de 5 vezes que a bibliografia antecedente sugere e com os quais os resultados têm sido bastante heterogéneos (Dhillon et al., 2012). O método de Choukroun aparenta

assim dar resposta a uma das maiores dúvidas da comunidade científica relativamente à utilização destes concentrados.

Outra das causas de divergência acerca dos concentrados de plaquetas é a força centrífuga utilizada nos processos de preparação. Investigadores observaram um decréscimo da viabilidade e vitalidade das plaquetas (doseando os factores de crescimento que estas libertam) com o aumento da força centrífuga utilizada na centrifugação (Malhotra et al., 2013). Forças centrífugas superiores a 800 g levam a uma diminuição da libertação de factores como o TGF- β , sugerindo que centrifugações demasiadamente agressivas levam a uma desgranulação prematura das plaquetas, assim como danificam o citoesqueleto plaquetário, fundamental para os fenómenos de agregação e formação de coágulos. Porém, a bibliografia revela que os vários métodos disponíveis e/ou cientificamente validados apresentam centrifugações de 3 a 20 minutos, com recurso a forças centrífugas de 160 a 3000 g (Ehrenfest et al., 2008). Adicionalmente, alguns protocolos utilizam duas centrifugações em vez de apenas uma, o que contribui ainda mais para a variabilidade do produto final. O binómio tempo vs. força centrífuga utilizada representa, assim, outra fonte de variabilidade que não deverá ser desprezada, principalmente pela preponderância que tem na qualidade e utilidade clínica do produto final (Malhotra et al., 2013). Uma vez mais, o protocolo de Choukroun aparenta ser vantajoso quando comparado pelos demais, em primeiro lugar pela utilização de apenas uma centrifugação com duração não muito longa e com recurso a forças centrífugas sempre inferiores a 800 g. Esta centrifugação suave influencia não só a viabilidade das plaquetas obtidas como também a qualidade e resistência da malha de fibrina que se obtém (algo já abordado numa fase prévia deste documento).

Não menos importante será referir que, frequentemente, a bibliografia apresenta a força centrífuga utilizada no processo de produção de concentrados de plaquetas sob a forma de rotações por minuto (RPM) e não com força centrífuga relativa em g's. A verdade é que se torna impossível comparar forças centrífugas quando representadas sobre a forma de RPM, dado que para centrífugas diferentes (dependendo do seu raio e da forma do seu rotor), ao mesmo valor de RPM correspondem forças centrífugas diferentes. De tal facto resulta que, em primeiro lugar, se torna impraticável a replicação dos protocolos usados nesses mesmos artigos quando apenas RPM são mencionadas. Em segundo lugar, a utilização destas unidades não permite perceber se se está na presença de um protocolo que utiliza forças centrífugas reduzidas ou elevadas, com tudo o que é inerente a este pormenor técnico (Malhotra et al., 2013). As RPM são convertíveis em força g sabendo o raio da centrífuga e sabendo se esta utiliza um rotor fixo ou giratório, através das seguintes fórmulas:

$$RPM = \sqrt{\frac{\text{Força centrífuga em g}}{(1,118 \times 10^{-6})(\text{Raio em mm})}} \quad \text{ou} \quad \text{Força g} = RPM^2 \times 1,118 \times 10^{-6} \times r \text{ (mm)}$$

Frequentemente, fruto do ênfase de que se dá à concentração de plaquetas, subvaloriza-se o volume final de concentrado de plaquetas que é obtido pelos vários métodos disponíveis (Malhotra et al., 2013). No entanto, este parâmetro não deve de todo ser ignorado. A utilidade dos concentrados de plaquetas como material de preenchimento de soluções de continuidade ósseas e tecidos moles depende também da quantidade de material que se consegue obter, a partir de um dado volume de sangue colhido. Frequentemente em técnicas que recorrem a dois passos de centrifugação, apenas um décimo do volume total de sangue colhido resulta em concentrado de plaquetas cirúrgica ou medicamente utilizável (Ehrenfest et al., 2008). O preenchimento, por exemplo, de osteotomias extensas ou a cirurgia reconstrutiva em regiões anatómicas com grande perda óssea, requer grande quantidade de material de enxerto o que inviabiliza a utilização de técnicas em que o produto final é tão reduzido, fazendo assim decrescer também o interesse da comunidade científica neste tipo de biomateriais. É provável que seja esse um dos factores limitantes a explicar o pequeno número de publicações registando a utilização de concentrados de plaquetas, por exemplo, em fracturas de ossos longos.

O método de Choukroun, por outro lado, assegura que 40% do volume de sangue colhido se converte numa malha de fibrina utilizável como material de enxerto (Ehrenfest et al., 2010a), tornando assim o seu uso mais defensável, principalmente do ponto de vista médico-veterinário, em que a colheita dos mesmos volumes de sangue utilizados em medicina humana representa uma quantidade percentual maior em relação ao volume total de sangue do paciente. Uma vez mais, este protocolo dá resposta a uma das limitações apontadas por vários autores à produção e utilização de concentrados de plaquetas (Malhotra et al., 2013). Por todas as razões supracitadas, torna-se verdadeiramente difícil estabelecer juízos sobre a utilidade clínica e/ou cirúrgica dos concentrados de plaquetas. É impossível estabelecer a utilidade destes biomateriais agrupando produtos cujo protocolo de obtenção nem sequer é idêntico e cuja classificação final, obedecendo à nomenclatura proposta por Ehrenfest et al., (2008), não é transversal a todos os produtos comparados. Actualmente, as revisões bibliográficas que pretendem discernir o contributo real dos concentrados de plaquetas para a Medicina e Cirurgia modernas peca por, invariavelmente, não mencionar separadamente os P-PRP, L-PRP, L-PRF e P-PRF, quando se tratam de produtos com diferenças consideráveis entre si. Consequentemente, os veredictos de tais revisões deverão ser interpretados com precaução, por frequentemente não diferenciarem produtos e técnicas, considerando diferentes biomateriais como parte de um todo que englobam sob a designação demasiadamente simplista de Concentrados de Plaquetas. A prova de que estas revisões são demasiado redutoras é a constatação de que se são citadas publicações em que os próprios autores não revelam o método de preparação do concentrado de plaquetas usado (Malhotra et al., 2013). Esta noção é particularmente importante para a

interpretação desta discussão, em que a abordagem mais incisiva sobre o método de Choukroun para a produção de L-PRF se justifica exactamente por não ser uma técnica agrupável com outras existentes. Por essa mesma razão, não são aplicáveis as críticas que a literatura faz aos concentrados de plaquetas em sentido lato (críticas essas já mencionadas no decorrer deste documento) ao L-PRF de Choukroun. Mais ainda, pelo que já foi descrito, é necessário sublinhar que o protocolo de Choukroun contraria e dá resposta a muitas das críticas feitas aos protocolos de produção de concentrados de plaquetas antecedentes e actuais, merecendo por isso especial atenção.

Todavia, o método de Choukroun apresenta limitações quando aplicado em pacientes de dimensões não equiparáveis aos humanos. Existem duas limitações principais a considerar: o tamanho dos pacientes (ao qual é proporcional o calibre dos vasos e a pressão sanguínea) e o volume vascular (também proporcional ao peso vivo do animal em causa), limitações essas que serão abordadas de seguida.

Na análise à literatura disponível sobre o L-PRF, é especialmente importante a espécie animal utilizada no ensaio. Ehrenfest, Lemo e Jimbo (2010) sublinharam a importância prática da escolha do modelo animal a utilizar. Referindo-se aos trabalhos de Jang et al., (2010) e de Lee et al., (2010), que utilizaram L-PRF com uma formulação de seda em pó como material de enxerto em coelhos, Ehrenfest et al., (2010c) afirmam ser impossível replicar o método de Choukroun para produção de L-PRF em coelhos.

Um dos princípios chave para a obtenção de L-PRF é a rapidez de colheita e a centrifugação imediata após colheita, visto serem usados sistemas de colheita sem anticoagulante. Quando a colheita é demorada e de velocidade irregular, o sangue começa a coagular e o coágulo obtido não adquire a estrutura do coágulo de L-PRF. O resultado de uma colheita deste tipo é um núcleo de fibrina irregular, em que a polimerização de fibrina é instável, sendo o conteúdo celular e molecular não reproduzível. Adicionalmente, torna-se tecnicamente difícil separar este núcleo de fibrina dos eritrócitos adjacentes, algo que a utilização do L-PRF de Choukroun exige (Ehrenfest et al., 2010c). Os autores justificam que, após terem tentado a produção de coágulos de L-PRF a partir de coelhos, o calibre dos vasos destes animais e a sua pressão sanguínea impedia a realização de uma colheita rápida, homogénea e com volume significativo para posterior obtenção de coágulos de L-PRF, mesmo quando recorrendo a Anestesiologistas experimentados de Medicina Humana e Veterinária para realizar a punção. Embora a colheita fosse pontualmente bem-sucedida num dos animais do grupo de teste, não era repetível em todos os animais envolvidos (Ehrenfest et al., 2010c). Assim, conclui-se que a utilização do método de Choukroun em animais de peso inferior a 5 kg é tecnicamente muito difícil ou impossível, inviabilizando a utilização deste protocolo em animais desta dimensão, tanto para fins Clínicos como Científicos.

Outra das limitações relativamente à utilização de animais de peso vivo inferior a 5 kg é a necessidade de volume razoável que a colheita inerente ao método de Choukroun implica (Ehrenfest et al., 2010c). A colheita de sangue em todas as espécies não deverá nunca exceder os 15-20% de volume sanguíneo total, sendo que a recuperação de uma colheita dessa magnitude demora 4 semanas a ser feita, enquanto uma colheita de 10% do volume total de sangue requer 2 semanas de recuperação para que o volume total e composição do sangue do animal sejam restaurados. Dando um exemplo prático, 10% do volume de sangue num coelho de 4 kg representa aproximadamente 22 mL, o que permite apenas a obtenção de 2 coágulos. Nos coelhos usados por Lee et al., (2010) em que o peso médio era de 2,3 kg, 10 mL de sangue foram colhidos a todos os animais, o que se aproxima do limite de 10% (que corresponde a 12,65 mL) e que apenas permite a obtenção de um coágulo (que representa uma quantidade limitada de material de enxerto) com relativa espoliação do volume total de sangue do animal (Ehrenfest et al., 2010c). Se considerarmos que uma das potenciais aplicações dos coágulos de L-PRF será o preenchimento de soluções de continuidade, em pacientes cujo volume vascular possa já estar comprometido (por consequência da própria lesão ou do mecanismo que lhe deu origem), a colheita de volumes de sangue com este peso relativo torna-se ainda mais danosa. Consequentemente, e para além do obstáculo técnico que constitui a colheita de sangue em animais de peso vivo inferior a 5 kg, acrescenta-se a objecção ética e médica à colheita de volumes de sangue percentualmente consideráveis como os potencialmente requeridos pelo protocolo de Choukroun. Esta será um dos grandes entraves à aplicação desta técnica em gatos, aliado à potencial dificuldade técnica da colheita.

Não são conhecidos outros entraves à utilização do protocolo de Choukroun, com excepção da preocupação expressa por O'Connell (2007), rapidamente desmistificada por Dohan, Del Corso e Charrier (2007). O'Connell (2007) levantou a hipótese de o revestimento interno de sílica dos tubos usados no protocolo de Choukroun ser potencialmente citotóxico para o destinatário dos coágulos. Porém, o estudo realizado por Ehrenfest et al. (2009a) sobre os efeitos do L-PRF em vários tipos de células (já mencionado previamente neste documento) nos quais foi avaliada a actividade metabólica celular por doseamentos da enzima succinato desidrogenase (representativa da respiração mitocondrial celular) demonstrou não só não haver citotoxicidade mensurável, registando ainda um possível efeito benéfico na respiração celular.

A sílica é usada em numerosos materiais para Dentisteria, incluindo como material de preenchimento ósseo (Dohan et al., 2007). Em Dentisteria, materiais à base de sílica são tidos como sendo dos mais bem tolerados pelos tecidos, em particular pelo tecido ósseo. A sílica é um material indispensável a este processo, sendo que é necessária para despoletar o processo de polimerização de fibrina que resulta na formação do coágulo dentro do tubo. Apenas tubos de vidro ou revestidos internamente por sílica poderão ser usados neste

processo. Dohan et al., (2007) conclui assim que embora, em teoria, os pacientes em que é aplicado L-PRF possam ficar em contacto com um pequeno número de partículas de sílica, estas não representam nenhum risco para a sua saúde. Comparativamente, a trombina bovina usada para despoletar a coagulação noutros protocolos de produção de concentrados de plaquetas representa um risco imunitário muito superior, tendo sido essa uma das razões pelas quais Choukroun desenvolveu o protocolo em análise (Dohan et al., 2007).

Numa tentativa de encontrar uma alternativa aos tubos revestidos por sílica, Tunali, Özdemir, Küçükodaci, Akman e Firatli (2012) propuseram a utilização de tubos de titânio para produção de L-PRF a partir de coelhos. Os coágulos obtidos foram usados para preencher uma área de mucosa e perióstio mandibular que foi rebatida, criando um *flap* que foi depois suturado sobre a membrana de L-PRF aplicada. Embora os autores afirmem que a colheita de sangue em coelhos com 5 meses de idade e peso vivo médio de 3 kg decorreu sem qualquer dificuldade, a fotografia de um dos coágulos que os autores publicam no artigo em questão revela uma massa de fibrina mais amorfa que o espectável com o protocolo de Choukroun (Tunali et al., 2012). Todavia, a utilização de tubos de titânio é uma alternativa que merece ser estudada com maior profundidade, em espécies que permitam uma venopunção mais simples, não esquecendo porém que a utilização de tubos deste material levariam necessariamente a um acréscimo nos custos associados a este processo. O aumento do custo dos consumíveis para realização da técnica iria directamente contra uma das grandes vantagens deste método: os baixos custos associados à realização da técnica, que a tornam acessível e viável em vários cenários clínicos, tanto de Medicina Humana como Veterinária.

8.2. O L-PRF como alternativa aos materiais de enxerto disponíveis em Ortopedia

O osso autólogo é tido como sendo o *gold standard* dos materiais de enxerto (Ragety & Griffon, 2011). É um material que reúne em si as três propriedades mais relevantes dos materiais de enxerto ósseos. É simultaneamente osteocondutor, osteoindutor e osteogénico, sendo imunologicamente compatível e não representando qualquer risco imunitário (Ragety & Griffon, 2011).

Porém, à utilização de osso autólogo como material de enxerto (seja sob a forma de fragmentos de osso cortical, esponjoso ou corticoesponjoso) tem várias limitações pela necessidade de realização de cirurgia numa superfície óssea adicional. Registam-se como principais limitações a dor pós-operatória (crónica e aguda), o aumento do risco de infecção, aumento do tempo cirúrgico, a variabilidade da qualidade do osso retirado para enxerto e a limitada quantidade de osso autólogo que é possível extrair para enxerto (Ragety & Griffon, 2011).

Myeroff e Archdeacon (2011) publicaram recentemente uma revisão sobre pontos utilizáveis para colheita de osso autólogo, assim como as técnicas cirúrgicas associadas e respectivas limitações. Os autores concluíram que a complicação mais frequentemente encontrada, associada à colheita de osso autólogo, era a dor na região dadora, sendo menos frequentes a lesão de nervos periféricos, formação de hematoma, ocorrência de infecção ou as fracturas do osso dador (Myeroff & Archdeacon, 2011).

A dor é uma preocupação crescente tanto em Medicina Humana como na sua congénere Veterinária. O facto de esta ser a complicação mais frequente da colheita de osso autólogo para enxerto, tanto a curto como a longo prazo (Myeroff & Archdeacon, 2011), tem levado ao aparecimento de diversos estudos retrospectivos e prospectivos em Humanos que avaliam a dor pós-operatória associada à colheita de osso autólogo. Todavia, esses mesmos estudos têm de ser analisados com precaução. O risco relatado para o aparecimento de complicações como a dor ou a perda de sensibilidade varia consideravelmente entre estudos, dependendo da população em estudo e da metodologia utilizada (Kim et al., 2009). A maioria dos estudos nesta área têm sido retrospectivos, estudos esses que são reconhecidamente mais imprecisos na determinação da percentagem de complicações pós-cirúrgicas (Kim et al., 2009).

Kim et al., publicaram em 2009 um estudo prospectivo cuidadosamente elaborado em que pretendiam avaliar o grau de dor e o aparecimento de complicações associados à utilização da crista ilíaca como fonte de osso autólogo para enxerto. Foram incluídos 110 pacientes que iriam proceder a fusão lombar electiva, em que o osso autólogo a usar como material de enxerto seria colhido da crista ilíaca. A dor pós-operatória foi mensurada com recurso a questionários especificamente elaborados para o efeito e através da utilização de uma escala visual de 0 a 100 (*visual analog scale* - VAS). Adicionalmente, pela dificuldade que representa para alguns pacientes a diferenciação entre a dor proveniente da região dadora do enxerto e a região lombar intervencionada, um dos intervenientes deste estudo dedicou-se a tempo inteiro à supervisão do preenchimento das escalas visuais de dor e dos inquéritos. Este operador ajudou ainda os pacientes a compararem o tipo, distribuição e gravidade de dor pré-operatória (registada antes da cirurgia) com a dor adquirida no momento da cirurgia (Kim et al., 2009).

Os resultados desse mesmo estudo (Kim et al., 2009) mostraram que a VAS média às 6 semanas de pós-operatório para a região dadora da crista ilíaca era de 22,7/100, sendo de 15,9/100 aos 6 meses de pós-operatório e de 16,1/100 aos 12 meses de pós-cirúrgico, alertando, no entanto, para os significativos desvios-padrão da amostra. Não se observou nenhuma diferença significativa no grau de dor relatado quando comparados os diferentes diagnósticos primários, a idade, género ou número de fusões vertebrais realizadas (Kim et al., 2009). Não foram encontradas diferenças nos resultados das VAS quando interpretados em função do cirurgião a operar, nem tão pouco quando observados comparando a

realização de uma única incisão para toda a intervenção com a criação de uma segunda incisão especificamente para aceder à crista da tibia (Kim et al., 2009).

O questionário levado a cabo ao longo de 12 meses revelou que 16,5% dos pacientes intervencionados demonstravam dor que consideravam ser mais intensa no local da região óssea dadora do que na região cirúrgica principal. 29,1% dos pacientes revelaram ainda sentir dormência, sendo que 11,3% referiu que essa dormência era incomodativa. Para 15,1% dos inquiridos, essa dor gerava dificuldade em andar, enquanto 14,1% manifestavam dificuldade em realizar as tarefas domésticas (Kim et al., 2009). Nenhum dos casos incluídos revelou complicações que acarretassem a necessidade de segunda intervenção cirúrgica. Mais concretamente, não foram observados hematomas significativos, infecções que implicassem desbridamento de tecidos e/ou lavagens cirúrgicas, fracturas da crista ilíaca ou herniações de tecidos moles através da osteotomia (Kim et al., 2009).

Estes resultados são particularmente importantes para sustentar a ideia de que existe, inerente à utilização de osso autólogo para material de enxerto, uma persistência de dor na região dadora de intensidade não menosprezável e que os visados consideraram limitante (Kim et al., 2009). Esta publicação é especialmente relevante, em primeiro lugar, pelo esforço feito para distinguir adequadamente a dor proveniente da região dadora do enxerto ósseo da dor resultante da cirurgia primária. Esta metodologia permitiu uma mensuração mais exacta do grau real de dor que a técnica de colheita de osso autólogo infligia. Em segundo lugar, o seguimento de 12 meses do qual foi alvo o grupo de pacientes estudado permitiu reconhecer a presença de dor crónica em vários pacientes, dor essa cujos valores médios registados apresentaram melhorias até aos 6 meses de pós-operatório, estabilizando depois no período entre os 6 meses e os 12 meses de pós-operatório (Kim et al., 2009).

Em teoria, não existe razão para pensar que a colheita de osso autólogo gere menos dor em em animais de companhia. É discutível que o acesso e/ou a colheita em determinados ossos possa ser mais dolorosa do que noutros, ou ainda que a técnica cirúrgica de colheita possa influenciar a persistência da dor pós-operatória. Todavia, nada leva a querer que não haja dor igualmente relevante associada a procedimentos análogos em espécies Veterinárias. Por esse mesmo motivo, a procura por materiais de enxerto alternativos ao osso autólogo é um tema bastante actual (Ragety & Griffon, 2011). Na verdade, já existem trabalhos publicados cujo objectivo era o de averiguar possíveis alternativas ao osso esponjoso no caso específico da TTA.

Em 2011, Guerrero et al., publicaram um estudo em que avaliavam a ossificação da osteotomia criada pela técnica de TTA, com e sem preenchimento por osso esponjoso autólogo. Neste trabalho, embora este se debruce sobre uma população pequena de indivíduos (n = 14), os autores observaram que não existia diferença significativa na ossificação da osteotomia quando comparados a utilização exclusiva de osso esponjoso

autólogo com a utilização de nenhum material de enxerto. A avaliação da ossificação foi feita utilizando uma metodologia de interpretação radiográfica validada por Hoffmann et al., (2006), à qual se agrupou um segundo método de análise das radiografias de controlo de pós-operatório, criado por Guerrero et al., (2011). Os autores legitimamente manifestaram com este trabalho a preocupação de que o uso de osso esponjoso autólogo aumenta o custo, tempo cirúrgico e morbilidade associada à cirurgia (Guerrero et al., 2011). Contudo, a não utilização de nenhum material de enxerto para preenchimento da osteotomia criada na TTA gerou alguma controvérsia, expressada muito claramente por Boudrieau (2011) na sua carta à revista *Veterinary Surgery*, onde Guerrero et al. deram a conhecer esse seu trabalho. Boudrieau (2011) insiste que:

(...) Colocar um enxerto ósseo num espaço de fractura é um princípio básico e desde há muito usado em ortopedia. Desconheço qualquer recomendação na literatura que verse sobre ortopedia (para além do presente artigo de Guerrero et al.) que faça uma recomendação que vá contra toda a evidência científica publicada. (...) Desconheço qualquer referência bibliográfica em que uma solução de continuidade metafisária não preenchida seja razoavelmente comparável a uma solução de continuidade a que foi aplicado um enxerto (Boudrieau, 2011, tradução livre).

O mesmo autor sublinha que estudos em cães, ovelhas, babuínos e coelhos demonstraram que a utilização de osso esponjoso autólogo permitiu uma reparação total e no intervalo mais curto de tempo possível das osteotomias criadas, contrastando com os grupos controlo desses mesmos estudos (no qual não foi utilizado nenhum tipo de enxerto) que não registaram cicatrização completa dos defeitos ósseos em análise, no decorrer do período experimental (Boudrieau, 2011). No estudo de Guerrero et al., (2011), Boudrieau alerta ainda para um tempo de cicatrização das osteotomias substancialmente maior nos animais a que não foi aplicado nenhum enxerto, quando comparado com o indicado por Lafaver, et al., (2007) numa amostra substancialmente maior (n = 101) em que a osteotomia da TTA era preenchida ou por osso esponjoso autólogo ou por um xenoimplante à base de matriz óssea desmineralizada.

Por fim, Boudrieau (2011) refere que, apesar dos riscos teóricos e vulgarmente mencionados como os já referidos (fractura do osso dador, osteomielite, entre outros) associados à colheita de osso autólogo, os poucos trabalhos disponíveis como o de Johnson (1986) demonstram que na prática esses acidentes são raros. Esse mesmo artigo versa sobre a colheita de osso esponjoso da tibia para enxerto ósseo em cães, que foi usada em 34 procedimentos, nos quais as únicas complicações a registar foram a infecção dos tecidos moles envolvidos na incisão em 3 cães por remoção da ligadura e posterior

infecção por lambadura e a formação de um traço de fractura que se estendia a partir do limite da incisão no osso por 18 mm (provavelmente por aplicação de força excessiva na curetagem de osso esponjoso). A fractura referida estava perfeitamente alinhada e cicatrizou por segunda intenção sem necessidade de outro tipo de intervenção para além da aplicação de uma ligadura no membro afectado (Johnson, 1986). Estes resultados estão em concordância com os trabalhos análogos conduzidos em pacientes humanos (e já abordados neste segmento desta dissertação) em que se refere que a complicação mais frequente da colheita de osso autólogo é a dor pós-operatória aguda e crónica, sendo que outras complicações acontecem apenas muito raramente. Sobre o trabalho de Johnson (1986) será, porém, importante referir que a osteotomia feita na tíbia dos animais envolvidos era circular, com diâmetro de 5,6 ou 7,9 mm (dependendo da trefina de Mitchell utilizada) e que o volume de osso recolhido variou entre 2 a 4 cm³ (sem, no entanto, ser referido um valor médio). Em primeiro lugar, esta osteotomia circular é radicalmente diferente da osteotomia criada pela técnica de TTA, em que a incisão feita no osso é substancialmente maior e angulada, o que por sua vez significa que a distribuição das forças aplicadas ao nível da incisão não é homogénea como acontece com a incisão circular utilizada por Johnson (1986). Em segundo lugar, será também importante realçar que provavelmente a quantidade de osso esponjoso retirado da tíbia de pacientes sujeitos a TTA se aproximará mais frequentemente dos 4 cm³ que dos 2 cm³. Por ambas as razões, a fragilidade da metáfise da tíbia após criação da osteotomia implicada na TTA e após colheita do osso esponjoso da tíbia será em teoria superior à fragilidade tibial dos animais intervencionados pela técnica que Johnson (1986) refere.

Por todas as razões supracitadas se conclui que, embora a aplicação de um material de enxerto em osteotomias como a associada à TTA seja uma prática sustentada pelos princípios base da cirurgia ortopédica, existem contrariedades associadas à colheita de osso autólogo, das quais a dor crónica parece ser a mais frequente. Simultaneamente, a dor será também a complicação mais difícil de documentar em espécies veterinárias, pela dificuldade que representa a interpretação e quantificação dos comportamentos de dor animal. Não havendo qualquer razão para presumir que não se verifica o mesmo tipo de dor associado aos procedimentos de colheita de osso autólogo em Medicina Veterinária, a utilização deste material de enxerto não deverá ser ponderada sem primeiro serem consideradas todas as alternativas disponíveis.

É como alternativa aos actuais materiais de enxerto que o L-PRF poderá ter um papel a desempenhar, sendo um dos objectivos do trabalho prático que integra esta dissertação o de averiguar a utilidade e o potencial deste biomaterial como material de enxerto. Quando agrupadas as 10 características preponderantes e desejáveis em materiais para enxerto ósseo (Ragety & Griffon, 2011), apercebemo-nos de que o L-PRF preenche (pelo menos parcialmente) 8 dessas qualidades, enumeradas de seguida. O L-PRF é um material

totalmente biocompatível e imunologicamente seguro por ser autólogo; é osteoindutor e osteocondutor, possui alguma resistência biomecânica (embora branda), é bioabsorvível (sendo integrado nos tecidos adjacentes de maneira fisiológica e fácil), é de preparação e manuseamento fáceis, permite a avaliação do crescimento ósseo posterior de maneira simples por não ter radiopacidade de tecido ósseo (sendo esse um obstáculo encontrado quando aplicadas matrizes ósseas sintéticas ou xenoimplantes, por exemplo) e por ter um baixo custo de utilização associado (Ragotly & Griffon, 2011). As razões por detrás da atribuição destas propriedades a este biomaterial foram sendo mencionadas e explicadas ao longo deste documento.

Importante será também mencionar um estudo que comparou a utilização exclusiva de osso esponjoso autólogo para preencher a osteotomia criada pela técnica de TTA com a utilização de um xenoimplante de origem bovina (Von Lande, Worth, Guerrero, Owen e Hartman, 2012). Nesse estudo, 48 animais receberam xenoimplantes (grupo de teste) e em 34 animais aplicou-se osso esponjoso autólogo (grupo controlo) na osteotomia em causa. Os resultados da análise radiográfica dos 39 pacientes a quem foi aplicado o xenoimplante e que tiveram um seguimento de 8 semanas, quando comparados com o grupo controlo, demonstraram não ter havido diferenças significativas no grau de enchimento da osteotomia, na osteointegração dos implantes ou da parte distal da osteotomia. As únicas diferenças estatisticamente relevantes a serem observadas foram a ossificação superior da região proximal no grupo em que se utilizou osso autólogo mas uma radiopacidade superior da osteotomia no grupo e que se aplicou xenoimplante. Os autores consideraram que a ossificação da osteotomia era idêntica entre os dois materiais de enxerto, realçando apenas que a utilização de osso esponjoso autólogo era superior na parte proximal da osteotomia (von Lande et al., 2012), reconhecidamente a zona de ossificação mais demorada.

8.3. Análise ao ensaio clínico

Até à data de entrega deste documento, não existia informação disponível na literatura sobre a aplicação do protocolo de Choukroun para a produção de L-PRF em cães. Como tal, a fase inicial deste trabalho prático consistiu na optimização e aferição desse mesmo protocolo em cães, etapa essa que permitiu pela primeira vez estabelecer os parâmetros de tempo e força a utilizar na centrifugação de sangue para obtenção de um produto sobreponível com o coágulo de L-PRF, obtido em pacientes humanos e descrito previamente neste documento.

No desenvolvimento do presente ensaio clínico, no qual se centra esta dissertação, foram encontradas essencialmente dois tipos de limitações. A mais preponderante, que mais acentuadamente afectou os resultados obtidos, é a diminuição do poder de compra dos donos dos pacientes veterinários. A Medicina Veterinária como actividade económica que se

insere totalmente na conjuntura actual de crise Económica e Social, conheceu um decréscimo significativo do seu volume de facturação, do qual é reflexo a diminuição das cirurgias levadas a cabo no Hospital Escolar da FMV-UL (HE FMV-UL). Tal facto conduziu a um decréscimo da casuística disponível para a realização do presente estudo. Embora o diagnóstico clínico de ruptura do ligamento cruzado cranial tenha sido efectuado com alguma frequência nas mesmas instalações hospitalares, a TTA não representou uma alternativa financeiramente viável para uma fracção não desprezável dos clientes. A título ilustrativo, refere-se que em períodos análogos de 2012 e 2011, o número de TTA's realizado no HE FMV-UL foi 55,6% e 33,3% superior, respectivamente.

A segunda grande limitação encontrada foi a falta de adesão dos proprietários às consultas e radiografias de seguimento, o elemento primordial de avaliação do eventual benefício trazido pela utilização de L-PRF. Quando estudada a população a incluir no grupo controlo, cedo se percebeu que os proprietários raramente traziam os animais ao segundo controlo radiográfico a efectuar às 8 semanas de pós-operatório, sendo que quando o faziam era frequentemente de maneira desfasada no tempo. Das 69 TTA's que constituíam a população a seleccionar para o grupo controlo, 40 atingiram a fase de selecção em função da periodicidade e quantidade de controlos radiográficos feitos. Dessas 40 TTA's, apenas 8 haviam sido submetidas às radiografias de 4 e 8 semanas de pós-operatório. Numa tentativa de aumentar a adesão dos proprietários aos seguimentos radiográficos, foram estabelecidos contactos telefónicos para relembrar as datas dos seguimentos e para simultaneamente tentar avaliar a curva de progressão clínica dos pacientes. Ao fim de 5 dias era feito novo contacto telefónico a perguntar se o proprietário mantinha a intenção de comparecer no HE FMV-UL, demonstrando-se sempre disponibilidade para acompanhar os seguimentos de maneira individualizada e pessoal. Todavia, das 9 TTA's em que foi possível a aplicação de L-PRF, uma não registou qualquer radiografia de seguimento, outra apenas registou uma radiografia de seguimento, existindo ainda uma terceira cuja única radiografia de controlo disponível tem um posicionamento que não permitiu a interpretação da ossificação da osteotomia. Ainda assim, 6 em 9 dessas TTA's tiveram pelo menos 2 seguimentos radiográficos em tempo útil, o que significa uma adesão dos proprietários 3,33 vezes superior ao demonstrado pelos proprietários do grupo controlo.

Os resultados do estudo radiográfico, pecam por isso, pelo pequeno número de animais envolvido. Todavia, procedeu-se uma análise gráfica das classificações obtidas pelas radiografias de controlo na tentativa de comparar, para a mesma fase de evolução do pós-operatório, a progressão da ossificação da osteotomia. Essas classificações foram atribuídas por dois operadores experimentados na área de Radiologia, sendo que ambos eram completamente alheios a toda a informação respeitante aos pacientes cujas radiografias estavam a classificar.

A comparação entre grupos no que respeita à classificação atribuída pelo Operador A, relativamente às 4 semanas de pós-operatório revela pontuações mais elevadas para o grupo de teste. Neste grupo, todos os elementos apresentaram pelo menos uma ponte óssea numa das localizações predefinidas. Apenas para o grupo controlo se considerou que alguns animais não evidenciassem pontes ósseas entre a crista da tíbia e a metáfise tibial.

Resultados idênticos foram obtidos pelo operador B para o mesmo instante de pós-operatório, em que as classificações atribuídas ao grupo de teste foram concordantemente mais elevadas que as do grupo controlo.

Quando comparada a evolução no momento do segundo controlo radiográfico, observam-se novamente classificações mais elevadas para o grupo de teste por ambos os operadores. O operador A considerou que apenas elementos do grupo de teste apresentavam pontes ósseas em todas as localizações predefinidas pelo esquema de avaliação sugerido por Hoffmann et al., (2006). Por outro lado, apenas em pacientes do grupo controlo se considerou que não tenha havido formação de pontes ósseas em nenhum dos pontos referidos, às 8 semanas de pós-operatório. Da mesma maneira, o Operador B considerou, 8 semanas após a cirurgia, todos os elementos do grupo de teste apresentavam pontes ósseas no mínimo em 2 dos 3 pontos referidos pela classificação de Hoffmann et al., (2006)., classificando como não tendo pontes ósseas apenas um elemento do grupo controlo. Deve acrescentar-se que na comparação feita às 8 semanas de pós-operatório, havia mais um elemento no grupo controlo do que no grupo de teste o que poderá ter enviesado a interpretação feita.

Embora as possíveis conclusões a retirar pela interpretação destes resultados seja reconhecidamente científica e estatisticamente frágeis, a indicação a registar é a de um possível benefício conseguido pela utilização de L-PRF, na velocidade de ossificação nas primeiras 8 semanas de pós-operatório. Evidentemente, mais estudos com populações maiores seriam necessários para atestar a validade científica desta conclusão, não deixando porém de ser uma indicação a considerar futuramente.

Adicionalmente foram comparados os poucos controlos radiográficos recolhidos, realizados às 12 semanas de pós-operatório. Esta avaliação peca por uma fragilidade ainda maior, na medida em que os 2 únicos seguimentos radiográficos disponíveis no grupo controlo pertencem a duas TTA's realizadas no mesmo paciente em momentos cirúrgicos diferentes. No grupo de teste existiam também apenas 2 controlos radiográficos feitos às 12 semanas para serem sujeitos a comparação. Ainda assim, relata-se que a avaliação feita segundo a referida escala radiográfica mostrou, segundo ambos os operadores, um grau de ossificação menor no grupo de teste que no grupo controlo.

Não menos importante foi o estudo histológico realizado a dois coágulos produzidos a partir de dois pacientes distintos, incluídos no grupo de teste. As duas colorações (Hematoxilina e Eosina e Tricrómio de Masson) aplicadas aos cortes histológicos de ambos os coágulos,

permitiram chegar à conclusão que o material obtido pela centrifugação de sangue colhido em sistema de vácuo a partir dos animais do grupo de teste era de facto classificável como L-PRF. A malha linear de fibrina, que num dos polos integra um aglomerado de plaquetas e leucócitos, englobando também alguns eritrócitos é totalmente sobreponível com o descrito por Ehrenfest et al., (2010a), no trabalho em que descreve a estrutura tridimensional dos coágulos de L-PRF. Esta garantia era fundamental pela inexistência, na bibliografia disponível, de referências à utilização da técnica de Choukroun em cães. Como tal, impunha-se a necessidade de saber se o binómio tempo x força g utilizado na centrifugação de sangue de pacientes humanos geraria o mesmo coágulo de L-PRF em cães. Assim se concluiu que a técnica é transponível para cães, com obtenção final de um coágulo de L-PRF em tudo idêntico ao obtido em pacientes humanos.

No que toca à avaliação feita pelos proprietários, 5 em 8 retribuíram os inquéritos devidamente respondidos. Dos inquiridos, todos recomendariam a TTA para resolução cirúrgica da ruptura do ligamento cruzado cranial. Quando questionados sobre o grau de satisfação com o procedimento, 4 em 5 classificaram-no como “ótimo” e 1 como “bom”. Três dos proprietários determinaram ainda que os seus animais tinham recuperado totalmente no momento do inquérito, quando comparavam o grau de actividade dos seus animais após a cirurgia com o período que antecedia a ruptura do ligamento cruzado. Dois dos donos consideraram que os seus animais, estabelecendo a mesma comparação, tinham recuperado grandemente. Relativamente à perpetuação no tempo da claudicação no pós-operatório, as respostas obtidas variaram entre 7-10 dias e 3 meses, sendo que dois proprietários referiram ter sido de um mês e um terceiro ter afirmado que o seu animal claudicou durante 2 meses após a cirurgia. Os resultados deste questionário revelam que a técnica produziu bons resultados clínicos, com ganhos de função e desaparecimento da claudicação no pós-operatório relativamente rápidos quando comparados com a evolução na após a cirurgia pela técnica “padrão”. O grau de satisfação dos proprietários é, na verdade, reflexo disso mesmo. Todavia, será sempre importante ter em mente que, muito embora os donos interessados sejam frequentemente bastante sensíveis na detecção de alterações posturais ou comportamentais, são porventura influenciados por alterações clinicamente irrelevantes como o atraso no crescimento do pêlo após a tricotomia pré-cirúrgica, entre outros. Essa subjectividade deverá sempre ser tida em conta na interpretação das respostas dadas em questionários do género.

9. CONCLUSÃO

O L-PRF aparenta ser uma alternativa viável aos actuais materiais de enxerto, possivelmente até como material único de enxerto. A transposição da técnica de Choukroun para a Clínica e Cirurgia de Animais de Companhia, mais precisamente em cães, provou ser possível com a obtenção de um produto com as mesmas características e qualidades daquele obtido em pacientes humanos e cujos benefícios estão já razoavelmente descritos. Contudo, a limitada casuística do trabalho prático não permitiu uma conclusão estatística e clinicamente significativa, não deixando este trabalho de fornecer uma indicação positiva para a utilização deste biomaterial e de estabelecer o protocolo para a sua utilização em animais de companhia. Outros estudos, em populações de maiores dimensões, seriam garantia de conclusões mais sustentadas.

10. BIBLIOGRAFIA

- Bisgard, S. K., Barnhart, M. D., Shiroma, J. T., Kennedy, S. C., & Schertel, E. R. (2011). The effect of cancellous autograft and novel plate design on radiographic healing and postoperative complications in tibial tuberosity advancement for cranial cruciate-deficient canine stifles. *Vet Surg*, 40(4), 402-407.
- Boudrieau, R. J. (2009). Tibial plateau leveling osteotomy or tibial tuberosity advancement? *Vet Surg*, 38(1), 1-22.
- Boudrieau, R. J. (2011). Letter to the Editor: Bone grafting and tibial tuberosity advancement. *Vet Surg*, 40, 641-643.
- Chang, I. C., Tsai, C. H., & Chang, Y. C. (2010). Platelet-rich fibrin modulates the expression of extracellular signal-regulated protein kinase and osteoprotegerin in human osteoblasts. *J Biomed Mater Res A*, 95(1), 327-332.
- Chang, Y. C., & Zhao, J. H. (2011). Effects of platelet-rich fibrin on human periodontal ligament fibroblasts and application for periodontal infrabony defects. *Aust Dent J*, 56(4), 365-371.
- Choukroun, J., Diss, A., Simonpieri, A., Girard, M. O., Schoeffler, C., Dohan, S. L., . . . Dohan, D. M. (2006a). Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 101(3), e56-60.
- Choukroun, J., Diss, A., Simonpieri, A., Girard, M. O., Schoeffler, C., Dohan, S. L., . . . Dohan, D. M. (2006b). Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 101(3), 299-303.
- Clark, R. A. F. (2006). Fibrin and wound healing. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 936, 355-367.
- Del Corso, M., Mazon, Z., Rutkowski, J. L., & Ehrenfest, D. M. D. (2012). The use of leukocyte- and platelet-rich fibrin during immediate postextractive implantation and loading for the esthetic replacement of a fractured maxillary central incisor. *J Oral Implantol*, 38(2), 181-187.
- Dhillon, R., Schwarz, E., Maloney, M. (2012). Platelet-rich plasma therapy - future or trend? *Arthritis Research & Therapy*, 14, 219-229.
- Diss, A., Dohan, D. M., Mouhyi, J., & Mahler, P. (2008). Osteotome sinus floor elevation using Choukroun's platelet-rich fibrin as grafting material: a 1-year prospective pilot study with microthreaded implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 105(5), 572-579.
- Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006a). Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 101(3), e37-44.
- Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006b). Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 101(3), e45-50.

- Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006c). Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 101(3), e51-55.
- Dohan, D. M., Del Corso, M., & Charrier, J.-B. (2007). Cytotoxicity analyses of Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) on a wide range of human cells: The answer to a commercial controversy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 103(5), 587-593.
- Ehrenfest, D. M. D., Rasmusson, L., & Albrektsson, T. (2008). Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*, 27(3), 158-167.
- Ehrenfest, D. M. D., Diss, A., Odin, G., Doglioli, P., Hippolyte, M. P., & Charrier, J. B. (2009a). In vitro effects of Choukroun's PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 108(3), 341-352.
- Ehrenfest, D. M. D., de Peppo, G. M., Doglioli, P., & Sammartino, G. (2009b). Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors*, 27(1), 63-69.
- Ehrenfest, D. M. D., Del Corso, M., Diss, A., Mouhyi, J., & Charrier, J. B. (2010a). Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *J Periodontol*, 81(4), 546-555.
- Ehrenfest, D. M. D., Doglioli, P., de Peppo, G. M., Del Corso, M., & Charrier, J. B. (2010b). Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. *Arch Oral Biol*, 55(3), 185-194.
- Ehrenfest, D. M. D., Lemo, N., Jimbo, R. (2010c). Selecting a relevant animal model for testing the in vivo effects of Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): rabbit tricks and traps. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 110(4), 413-415.
- Douglas, T. E., Gassling, V., Declercq, H. A., Purcz, N., Pamula, E., Haugen, H. J., . . . Leeuwenburgh, S. C. (2012). Enzymatically induced mineralization of platelet-rich fibrin. *J Biomed Mater Res A*, 100(5), 1335-1346.
- Freymiller, E. G., & Aghaloo, T. L. (2004). Platelet-rich plasma: ready or not? *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 62(4), 484-488.
- Fossum, T. W., Hedlund, C. S., Johnson, A. L., Seim, H. B., Willard, M. D., Bahr, A., Carroll G. L. (2007). *Small Animal Surgery*. (Third Edition). St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier.
- Gassling, V., Douglas, T., Warnke, P. H., Acil, Y., Wiltfang, J., & Becker, S. T. (2010). Platelet-rich fibrin membranes as scaffolds for periosteal tissue engineering. *Clin Oral Implants Res*, 21(5), 543-549.
- Guerrero, T. G., Makara, M. A., Katiofsky, K., Fluckiger, M. A., Morgan, J. P., Haessig, M., & Montavon, P. M. (2011). Comparison of healing of the osteotomy gap after tibial tuberosity advancement with and without use of an autogenous cancellous bone graft. *Vet Surg*, 40(1), 27-33.

- Gurbuzer, B., Pikkoken, L., Tunali, M., Urhan, M., Kucukodaci, Z., & Ercan, F. (2010). Scintigraphic evaluation of osteoblastic activity in extraction sockets treated with platelet-rich fibrin. *J Oral Maxillofac Surg*, 68(5), 980-989.
- He, L., Lin, Y., Hu, X., Zhang, Y., & Wu, H. (2009). A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 108(5), 707-713.
- Hoaglin, D. R., & Lines, G. K. (2013). Prevention of localized osteitis in mandibular third-molar sites using platelet-rich fibrin. *Int J Dent*, 2013, 875380.
- Hoffmann, D. E., Miller, J. M., Ober, C. P., Lanz, O. I., Martin, R. A., Shires, P. K. (2006). Tibial tuberosity advancement in 65 canine stifles. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 19, 219-227.
- Inchingolo, F., Tatullo, M., Marrelli, M., Inchingolo, A. M., Scacco, S., Inchingolo, A.D., Dipalma, G., Vermesan, D., Abbinante, A., Cagiano, R. (2010). Trial with platelet-rich fibrin and Bio-Oss used as grafting materials in the treatment of the severe maxillar bone atrophy: clinical and radiological evaluations. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 14, 1075-1084.
- Iqbal, J., Pepkowitz, S. H., & Klapper, E. (2011). Platelet-rich plasma for the replenishment of bone. *Curr Osteoporos Rep*, 9(4), 258-263.
- Jang, E. S., Park, J. W., Kweon, H., Lee, K. G., Kang, S. W., Baek, D. H., . . . Kim, S. G. (2010). Restoration of peri-implant defects in immediate implant installations by Choukroun platelet-rich fibrin and silk fibroin powder combination graft. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 109(6), 831-836.
- Jayalakshmi, K. B., Agarwal, S., Singh, M. P., Vishwanath, B. T., Krishna, A., & Agrawal, R. (2012). Platelet-Rich Fibrin with beta-Tricalcium Phosphate-A Novel Approach for Bone Augmentation in Chronic Periapical Lesion: A Case Report. *Case Rep Dent*, 2012, 902858.
- Johnson, K. A. (1986). Cancellous bone graft collection from the tibia in dogs. *Vet Surg*, 14 (4), 334-338.
- Kanthan, S. R., Kavitha, G., Addi, S., Choon, D. S., & Kamarul, T. (2011). Platelet-rich plasma (PRP) enhances bone healing in non-united critical-sized defects: a preliminary study involving rabbit models. *Injury*, 42(8), 782-789.
- Kim, D. H., Rhim, R., Li, L., Martha, J., Swaim, B. H., Banco, R. J., . . . Tromanhauser, S. G. (2009). Prospective study of iliac crest bone graft harvest site pain and morbidity. *Spine J*, 9(11), 886-892.
- Kim, S.-G., Kim, J.-Y., & Choi, J.-Y. (2010). The route from mission impossible to Columbus's egg: An easy means of platelet-rich-fibrin (PRF) production in the rabbit. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 110(4), 416-418.
- Kobayashi, M., Kawase, T., Horimizu, M., Okuda, K., Wolff, L. F., & Yoshie, H. (2012). A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use. *Biologicals*, 40(5), 323-329.
- Lafaver, S., Miller, N. A., Stubbs, W. P., Taylor, R. A., & Boudrieau, R. J. (2007). Tibial tuberosity advancement for stabilization of the canine cranial cruciate ligament-

- deficient stifle joint: surgical technique, early results, and complications in 101 dogs. *Vet Surg*, 36(6), 573-586.
- Lee, E. H., Kim, J. Y., Kweon, H. Y., Jo, Y. Y., Min, S. K., Park, Y. W., . . . Kim, S. G. (2010). A combination graft of low-molecular-weight silk fibroin with Choukroun platelet-rich fibrin for rabbit calvarial defect. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 109(5), e33-38.
- Lekovic, V., Milinkovic, I., Aleksic, Z., Jankovic, S., Stankovic, P., Kenney, E. B., & Camargo, P. M. (2012). Platelet-rich fibrin and bovine porous bone mineral vs. platelet-rich fibrin in the treatment of intrabony periodontal defects. *J Periodontal Res*, 47(4), 409-417.
- Li, Q., Pan, S., Dangaria, S. J., Gopinathan, G., Kolokythas, A., Chu, S., . . . Luan, X. (2013). Platelet-rich fibrin promotes periodontal regeneration and enhances alveolar bone augmentation. *Biomed Res Int*, 2013, 638043.
- Malhotra, A., Pelletier, M. H., Yu, Y., & Walsh, W. R. (2013). Can platelet-rich plasma (PRP) improve bone healing? A comparison between the theory and experimental outcomes. *Arch Orthop Trauma Surg*, 133(2), 153-165.
- Mazor, Z., Horowitz, R. A., Del Corso, M., Prasad, H. S., Rohrer, M. D., & Ehrenfest, D. M. D. (2009). Sinus floor augmentation with simultaneous implant placement using Choukroun's platelet-rich fibrin as the sole grafting material: a radiologic and histologic study at 6 months. *J Periodontol*, 80(12), 2056-2064.
- McMichael, M. (2012). Topical review: New models of Hemostasis. *Topics in companion animal medicine*, (27), 40-45.
- Montavon, P. M., Damur, D. M., Tepic, S. (2002). Advancement of the tibial tuberosity for the treatment of cranial cruciate deficient canine stifle. 1st World Orthopaedic Veterinary Congress
- Myeroff, C., & Archdeacon, M. (2011). Autogenous bone graft: donor sites and techniques. *J Bone Joint Surg Am*, 93(23), 2227-2236.
- Nurden, A., Nurden, P., Sanchez, M., Andia, I., Anitua, E. (2008). Platelets and wound healing. *Frontiers in Bioscience*, 13, 3525-3548.
- Penwick, R. C., Mosier, D. A., Clark, D. M. (1991). Healing of canine autogenous cancellous bone graft donor sites. *Veterinary Surgery*, 20(4), 229-234.
- Prakash, S., & Thakur, A. (2011). Platelet concentrates: past, present and future. *J Maxillofac Oral Surg*, 10(1), 45-49.
- Ragetly, G. R., Griffon, D. J., (2011). The rationale behind novel bone grafting techniques in small animals. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 24 (1), 1-8.
- Sammartino, G., Ehrenfest, D. M. D., Carile, F., Tia, M., & Bucci, P. (2011). Prevention of hemorrhagic complications after dental extractions into open heart surgery patients under anticoagulant therapy: the use of leukocyte- and platelet-rich fibrin. *J Oral Implantol*, 37(6), 681-690.
- Simonpieri, A., Choukroun, J., Del Corso, M., Sammartino, G., & Ehrenfest, D. M. D. (2011). Simultaneous sinus-lift and implantation using microthreaded implants and leukocyte- and platelet-rich fibrin as sole grafting material: a six-year experience. *Implant Dent*, 20(1), 2-12.

- Stief, M., Gottschalk, J., Ionita, J. C., Einspanier, A., Oechtering, G., & Bottcher, P. (2011). Concentration of platelets and growth factors in canine autologous conditioned plasma. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 24(2), 122-125.
- Su, C. Y., Kuo, Y. P., Tseng, Y. H., Su, C. H., & Burnouf, T. (2009). In vitro release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): a proposal to optimize the clinical applications of PRF. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 108(1), 56-61.
- Tatullo, M., Marrelli, M., Cassetta, M., Pacifici, A., Stefanelli, L. V., Scacco, S., . . . Inchingolo, F. (2012). Platelet Rich Fibrin (P.R.F.) in reconstructive surgery of atrophied maxillary bones: clinical and histological evaluations. *Int J Med Sci*, 9(10), 872-880.
- Tobias, K. M., Johnston, S. A. (2012). *Veterinary Surgery: Small Animal*. St Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Tunali, M., Ozdemir, H., Kucukodaci, Z., Akman, S., & Firatli, E. (2013). In vivo evaluation of titanium-prepared platelet-rich fibrin (T-PRF): a new platelet concentrate. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 51(5), 438-443.
- von Lande, R. G., Worth, A. J., Guerrero, T. G., Owen, M. C., & Hartman, A. (2012). Comparison between a novel bovine xenograft and autogenous cancellous bone graft in tibial tuberosity advancement. *Vet Surg*, 41(5), 559-567.
- Wolf, R. E., Scavelli, T. D., Hoelzler, M. G., Fulcher, R. P., Bastian, R. P. (2012). Surgical and postoperative complications associated with tibial tuberosity advancement for cranial cruciate ligament rupture in dogs: 458 cases (2007-2009). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 240, 1481-1487.
- Wu, C. L., Lee, S. S., Tsai, C. H., Lu, K. H., Zhao, J. H., & Chang, Y. C. (2012). Platelet-rich fibrin increases cell attachment, proliferation and collagen-related protein expression of human osteoblasts. *Aust Dent J*, 57(2), 207-212.
- Zhang, Y., Tangl, S., Huber, C. D., Lin, Y., Qiu, L., & Rausch-Fan, X. (2012). Effects of Choukroun's platelet-rich fibrin on bone regeneration in combination with deproteinized bovine bone mineral in maxillary sinus augmentation: a histological and histomorphometric study. *J Craniomaxillofac Surg*, 40(4), 321-328.

11. ANEXOS

Inquérito realizado aos proprietários dos animais do grupo de teste:

1 - Antes da cirurgia o meu cão coxeava:

- a. Nunca
- b. Só após exercício intenso
- c. Depois de passeios curtos
- d. Depois de estar em repouso
- e. Sempre

2 - 2 meses após a cirurgia, o meu cão coxeava:

- a. Nunca
- b. Só após exercício intenso
- c. Depois de passeios curtos
- d. Depois de estar em repouso
- e. Sempre

3 - O nível actividade do meu cão, comparado com o seu comportamento imediatamente antes da cirurgia:

- a. Melhorou bastante
- b. Melhorou ligeiramente
- c. Mantém-se
- d. Ligeiramente pior
- e. Muito pior

4 - O nível actividade do meu cão, comparando com o seu comportamento até ter feito a ruptura do ligamento cruzado cranial:

- a. Recuperou totalmente
- b. Recuperou grandemente
- c. Recuperou em parte
- d. Deteriorou-se um pouco
- e. Deteriorou-se muito

5 - Diga o seu grau de satisfação com o procedimento no global:

- a. Ótimo
- b. Bom
- c. Razoável
- d. Mediocre
- e. Fraco

6 - Recomendaria a TTA como técnica para resolução deste problema?

- a. Sim
- b. Preferiria considerar outras alternativas primeiro
- c. Só se não houvesse alternativa
- d. Nunca

7 - Quanto tempo é que o seu cão coxeou antes da cirurgia?

8 - Quanto tempo é que o seu cão coxeou depois da cirurgia?
